

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Ecología



**ECOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DEL BISBITA
CAMPESTRE (*Anthus campestris*) EN LOS PÁRAMOS
IBÉRICOS**

Memoria presentada por **María Calero Riestra** para
optar al
Grado de Doctor en Ecología
por la Universidad Autónoma de Madrid

Bajo la dirección del doctor:
Jesús García González
Científico Titular
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

TESIS DOCTORAL
Madrid, noviembre de 2015

A mi abuelo y a Quico

Estructura de la Memoria de Tesis

Esta memoria de tesis se articula en torno cinco grandes secciones, la primera de las cuales (bloque I) consiste en una INTRODUCCIÓN GENERAL donde se establece el marco conceptual del trabajo, las motivaciones para llevar a cabo la investigación y los principales objetivos planteados. En la segunda (bloque II) se detalla la METODOLOGÍA GENERAL que se ha utilizado durante la investigación para llevar a cabo tareas generales tanto de campo como de laboratorio. Esta metodología se complementa con otra más específica utilizada para cubrir objetivos concretos, y que se ha incluido en cada uno de los apartados correspondientes a lo largo de la memoria. En los dos siguientes bloques se exponen los principales RESULTADOS de la investigación, divididos en dos partes: de un lado (bloque III) el estudio de los parámetros reproductivos de la especie de estudio y de algunos factores ecológicos que tienen repercusión en su reproducción, como la estacionalidad de los recursos, la depredación de nidos o los parásitos, y de otro lado (bloque IV) se presenta la información relativa a las estrategias de apareamiento en la especie, así como sus efectos sobre el éxito reproductor de los individuos. Cada uno de estos dos bloques temáticos de resultados incluyen una breve introducción y la correspondiente discusión de los principales hallazgos. Para finalizar, el bloque V ofrece una breve SÍNTESIS Y CONCLUSIONES generales de la investigación realizada.

Financiación:

La investigación cuyos principales resultados se presentan en esta memoria ha sido parcialmente financiada por:

- Consejo Superior de Investigaciones Científicas (programa I3P de becas predoctorales)
- Proyectos de investigación de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (PAC06-0137 y PII1C09-0128-4724)
- Proyecto intramural CSIC (PIE 201030I019)

ÍNDICE

Lista de Tablas	1
Lista de Figuras	2
I. Introducción	3
II. Metodología general	11
1. Especie de estudio.....	13
2. Áreas de estudio.....	16
3. Metodología del trabajo de campo.....	21
3.1. Seguimiento general de la reproducción y búsqueda de nidos.....	21
3.2. Estimación de la fecha de puesta.....	23
3.3. Captura, marcaje y procesado de adultos en la población.....	24
3.4. Marcaje y procesado de los pollos.....	27
3.5. Estimación de la edad de los pollos.....	29
3.6. Estimación de la tasa de supervivencia diaria de los nidos.....	29
4. Metodología del trabajo de laboratorio.....	31
4.1 Extracción de ADN y sexado molecular.....	31
III. Reproducción, depredación y parásitos	33
1. Descripción de los parámetros reproductivos.....	37
1.1. Datos utilizados y descripción de las variables.....	37
1.2. Análisis estadísticos.....	38
1.3. Resultados.....	39
2. Dobles puestas y puestas de reposición.....	46
2.1. Metodología.....	47
2.2. Resultados y discusión.....	48
3. Fracasos durante la reproducción y depredación de nidos.....	51
3.1. Metodología.....	51

3.2. Resultados.....	52
3.3. Efecto del seguimiento de los nidos en los fracasos reproductivos.....	54
4. Parásitos sanguíneos: prevalencia y efecto en adultos y pollos.....	55
4.1. Metodología.....	55
4.2. Resultados.....	59
5. Discusión.....	65
5.1. Parámetros reproductivos.....	65
5.2. Efecto de los parásitos de la malaria sobre la reproducción.....	71
 IV. Estrategias de apareamiento	 37
1. Aislamiento y optimización de un panel de marcadores moleculares.....	86
1.1. Metodología.....	87
1.2. Resultados.....	90
2. Descripción de las estrategias de apareamiento.....	96
2.1. Determinación de parentesco, descripción de las variables y métodos estadísticos.....	96
2.2. Resultados.....	99
3. Éxito reproductivo en machos y hembras asociado a las diferentes estrategias de apareamiento.....	105
3.1. Descripción de las variables.....	105
3.2. Análisis estadísticos.....	107
3.3. Resultados.....	108
4. Discusión.....	114
 V. Conclusiones	 125
 Bibliografía	 131
 Agradecimientos	 145

Lista de Figuras

Figura II.1. Zonas de estudio y densidades de bisbita campestre.

Figura II.2. Paisaje típico del páramo de Layna.

Figura II.3. Paisaje típico de los Llanos de las Valeras.

Figura II.4. Ortofotografía de la zona de estudio de Valeria y disposición de los nidos de bisbita campestre.

Figura II.5. Estructura de la vegetación alrededor de un nido de bisbita campestre.

Figura II.6. Macho de bisbita campestre capturado con cebo malla.

Figura II.7. Toma de datos de un pollo de bisbita campestre.

Figura II.8. Curvas de crecimiento de los pollos de bisbita campestre.

Figura III.1. Distribución del bisbita campestre en la época reproductora.

Figura III.2. Distribución de las puestas a lo largo del periodo reproductor en las poblaciones de estudio.

Figura III.3. Variación estacional de los parámetros reproductivos.

Figura III.4. Probabilidad de fracaso del nido.

Figura III.5. Probabilidad de realizar puestas de sustitución y dobles puestas.

Figura III.6. Relación entre abundancia de pollos y depredación de nidos.

Figura III.7. Relaciones filogenéticas de los parásitos de la malaria en bisbitas.

Figura III.8. Efecto de las infecciones de malaria aviar sobre la condición corporal en adultos.

Figura III.9. Efecto de las infecciones de malaria aviar sobre el crecimiento de los pollos.

Figura IV.1. Número de huevos eclosionados para machos y hembras en función de su estrategia de apareamiento (monogamia y poligamia).

Figura IV.2. Número de pollos que llegar a abandonar el nido para machos y hembras en función de su estrategia de apareamiento (monogamia y poligamia).

Figura IV.3. Tasa de vuelo para machos y hembras en función de su estrategia de apareamiento (monogamia y poligamia).

Lista de Tablas

Tabla II.1. Tamaños muestrales de adultos, pollos y nidos estudiados.

Tabla III.1. Parámetros reproductivos en las dos zonas de estudio.

Tabla III.2. Variación estacional de los parámetros reproductivos.

Tabla III.3. Prevalencia de parásitos e infecciones por edades y sexos.

Tabla III.4. Probabilidad de infección en función del sexo y edad del hospedador.

Tabla III.5. Parámetros reproductivos obtenidos en estudios previos sobre la especie.

Tabla IV.1. Microsatélites utilizados en el bisbita campestre.

Tabla IV.2. Pruebas cruzadas de los microsatélite en 17 especies de aves esteparias.

Tabla IV.3. Diversidad genética para los 16 loci microsatélite utilizados en esta tesis.

Tabla IV.4. Número de nidos, pollos y polladas completas consideradas en los análisis.

Tabla IV.5. Parentesco dentro de la pollada (número y porcentaje de pollos y de polladas).

Tabla IV.6. Número de huevos eclosionados en función del sexo, estrategia de apareamiento, y estrategia de la pareja.

Tabla IV.7. Número de pollos que abandonan el nido en función del sexo, estrategia de apareamiento, y estrategia de la pareja.

Tabla IV.8. Tasa de vuelo en función del sexo, estrategia de apareamiento, y estrategia de la pareja.

Tabla IV.9. Parámetros reproductivos de machos y hembras en función de su estrategia de apareamiento.

I. INTRODUCCIÓN

Darwin introdujo la idea de que las variaciones individuales permiten a los organismos adaptarse al ambiente en el que viven, siempre y cuando dichas variaciones influyan en sus expectativas de reproducirse y sobrevivir con éxito (Darwin 1859). De esta forma, la selección natural actuaría a través de la competencia entre individuos por reproducirse y sobrevivir. Uno de los retos mas apasionantes de la ecología evolutiva sigue siendo el de tratar de comprender desde una perspectiva evolutiva cómo se relacionan los organismos con el ambiente en que viven a lo largo de cada una de las fases de su ciclo vital.

Los organismos han de hacer frente de forma permanente a una serie de restricciones o limitaciones impuestas por el ambiente, –como la disponibilidad de alimento o la abundancia de depredadores, competidores y parásitos–, que influyen en la cantidad de individuos en la población que viven, mueren y se reproducen con éxito (Solomon 1949). La prueba mas evidente de esto es que las poblaciones tienden a aumentar en condiciones favorables y a disminuir cuando éstas son desfavorables. Hacer frente a estas presiones externas suele entrar en conflicto con cubrir las necesidades internas que en ocasiones son muy costosas, incluyendo la capacidad para reproducirse y producir descendientes. La teoría de las estrategias vitales, entendidas como el conjunto de rasgos asociados a la variación en fecundidad y supervivencia a lo largo de la vida de un organismo (Moreno 2002), proporciona el marco conceptual para comprender cómo la selección natural ha ido moldeando el ciclo vital de las especies de forma que puedan optimizar su éxito reproductivo (Charnov1993, Roff 1992, Stearns 1992).

En este contexto, el conocimiento de los principales factores ecológicos que afectan a las poblaciones y de cómo los organismos resuelven los desafíos impuestos por el ambiente es esencial para entender los procesos de adaptación de los organismos al entorno y el modo en que opera la selección natural. Este conocimiento adquiere especial importancia en ambientes en los que los factores ecológicos ejercen una fuerte presión de selección sobre la capacidad

I. INTRODUCCIÓN

de reproducirse de los individuos, como los ambientes pobres en recursos tróficos o los ambientes ricos en depredadores, competidores y parásitos. El estudio de la reproducción –como una de las actividades mas costosas para los organismos– en ambientes estacionales, donde la reproducción está limitada a un corto periodo de tiempo a lo largo del año, es ideal para investigar estas cuestiones.

Las zonas templadas se caracterizan por mostrar variaciones estacionales importantes en cuanto a disponibilidad de alimento para los organismos situados en los niveles tróficos superiores (Fretwell 1972), variaciones que condicionan gran parte del ciclo vital de las especies presentes en estas zonas. Puesto que la fenología de las especies ha evolucionado para adaptarse a las condiciones ambientales presentes en cada zona a fin de maximizar el éxito reproductivo de los individuos (Futuyama 1998, Winkler 2002), un ejemplo claro de el efecto de la estacionalidad sobre las especies puede apreciar en las aves, donde la reproducción en ambientes estacionales está restringida al corto periodo de tiempo del año en el que la disponibilidad de alimento permite cubrir las necesidades tróficas para el individuo y su descendencia (Stenseth & Mysterud 2002).

Dentro del continente Europeo como ejemplo de zona templada, la región mediterránea ofrece un escenario particularmente interesante para el estudio de la reproducción en aves, debido a sus particularidades en cuanto a la estacionalidad de los recursos y otras condiciones ecológicas que han sido poco exploradas en la literatura científica existente (Moreno 2004). Hay que tener en cuenta que desde los estudios pioneros de David Lack (1954, 1966) sobre la reproducción en aves, la mayor parte de la investigación realizada en Europa procede de estudios realizados en latitudes del centro y norte del continente. Sin embargo, algunas singularidades del mediterráneo, como las restricciones hídricas, la menor abundancia de alimento, la existencia de ambientes muy simplificados o la mayor presión de depredación en dichos ambientes, amplían el abanico conocido de condiciones a las que los individuos deben enfrentarse y proporcionan un marco ideal para el estudio de muchos paradigmas establecidos respecto a las relaciones individuos-ambiente.

Esta región de Europa es, además, crucial desde el punto de vista de la conservación de la Biodiversidad. La mayor parte de las poblaciones de muchas especies con una situación desfavorable en cuanto a su conservación en Europa aún mantienen buenas poblaciones en zonas mediterráneas (López-López 2011). Este es el caso de muchas especies de aves, y en especial de los passeriformes esteparios. Estas aves viven y se reproducen en ambientes muy restrictivos en cuanto a las condiciones climáticas y la disponibilidad de alimento. También son paisajes tremendamente simplificados en cuanto a la estructura del hábitat, lo que suele llevar aparejado una mayor presión de depredación sobre los nidos, especialmente en aves que nidifican en el suelo (Martin 1993, Yanes & Suárez 1997). Por lo tanto, los passeriformes esteparios son un grupo particularmente adecuado para estudiar cómo los individuos resuelven los desafíos impuestos por las condiciones ambientales en el mediterráneo y logran reproducirse con éxito.

Pese al indudable interés que tienen los estudios ecológico-evolutivos sobre la reproducción de estas especies en el mediterráneo, sobre muchas de ellas sigue existiendo un nivel de desconocimiento sorprendente (Moreno 2004). En comparación con el conocimiento adquirido en las últimas décadas sobre aves forestales, por ejemplo, los estudios sobre aves esteparias (en especial passeriformes) siguen siendo muy escasos. Esto no sólo limita nuestro conocimiento general sobre la ecología de las aves, restringiendo el rango de escenarios y especies estudiadas, sino que compromete seriamente nuestra capacidad para conservar de forma eficaz algunas de estas especies ante eventuales problemas de conservación.

Con esta tesis se pretende cubrir algunas de estas deficiencias en el conocimiento mediante el estudio de la reproducción del bisbita campestre *Anthus campestris*, una especie de passeriforme estepario para el que apenas existe información científica y que sin embargo presenta unas características muy interesantes (véase apartado II.1 *Especie de estudio*) para abordar cuestiones ecológico-evolutivas.

Propósito de la tesis

Esta investigación tiene como objetivo principal aumentar el conocimiento existente sobre la reproducción del bisbita campestre, uno de los paseriformes esteparios peor conocidos de Europa. Se estudia su reproducción en ambientes esteparios localizados en los páramos ibéricos, donde la especie parece persistir en poblaciones aparentemente saludables. Pese a que las poblaciones de esta especie han disminuído de forma considerable en gran parte del área de su distribución Europea debido a cambios en los usos del suelo (Birdlife International 2004, Van Turnhout 2005), aún es bastante común en la península ibérica (Carrascal & Palomino 2008). Es una especie particularmente frecuente en la zona de páramos ibéricos donde he desarrollado mi investigación. Por lo tanto, conocer los mecanismos y las principales variables que en estos ambientes operan sobre el éxito del bisbita campestre tanto a nivel individual como poblacional es esencial para su conservación a una escala mas general.

Al margen de los beneficios que esta investigación pueda tener para la conservación del bisbita campestre, con esta tesis se pretende también profundizar en varios de los temas que habitualmente trata la ecología desde una perspectiva evolutiva, investigando sobre un nuevo modelo de estudio. Puesto que, como se ha indicado anteriormente, las especies han evolucionado desarrollando estrategias que les permitan adaptarse o hacer frente a la variabilidad ambiental y ser óptimos a la hora de acceder a los recursos localmente, son importantes los estudios sobre ecología de la reproducción en diferentes ambientes y con diferentes modelos de estudio. Mi investigación se lleva a cabo en ambientes naturales (esteparios) situados en latitudes mediterráneas, que están caracterizados por tener unas condiciones ambientales muy diferentes a las que se dan en latitudes mas septentrionales (donde se ha desarrollado la mayor parte de la investigación sobre la reproducción de las aves europeas). Así pues, la ecología de la reproducción en latitudes meridionales puede aportar información clave para entender mejor las estrategias reproductivas de las aves.

En este contexto, se comienza la tesis aportando información sobre la reproducción del bisbita campestre en ambientes esteparios mediterráneos. Se ha llevado a cabo un estudio sobre la reproducción de la especie en dos poblaciones diferentes, incidiendo en el análisis de las variaciones (entre años, entre zonas, y estacionales) de los principales parámetros reproductivos de la especie. Se explora después el efecto de la depredación de nidos en la reproducción y su relación con la fenología de la especie, discutiéndose los resultados en un contexto de estacionalidad de los recursos. A continuación, y puesto que los parásitos son otro de los principales factores junto con la depredación que pueden influir de forma decisiva en la reproducción de las aves, se examina la prevalencia de los parásitos sanguíneos del grupo de la malaria aviar en las dos poblaciones de bisbita campestre, y se analiza su impacto sobre adultos y pollos en las poblaciones.

Una vez que se ha descrito y estudiado cómo los factores antes mencionados (depredación, parásitos) afectan a la reproducción, me planteo si la especie ha desarrollado estrategias o mecanismos específicos para hacer frente a las condiciones existentes durante la reproducción en estas latitudes, en especial a las altas tasas de depredación de nidos y a la estacionalidad de los recursos. La estacionalidad impone límites claros al tiempo disponible para reproducirse en estos ambientes y reduce la probabilidad de realizar varias puestas en una misma temporada de cría, que podría ser un mecanismo válido de compensación de las pérdidas debidas a la depredación. Los individuos, sin embargo, podrían tratar de compensar o minimizar los costes por depredación con estrategias de apareamiento que les permitiese aumentar el número de descendientes producidos, como la poligamia. De esta forma, se aborda un estudio exhaustivo y se describen por primera vez las estrategias de apareamiento de la especie desde un punto de vista genético.

Ante las evidencias encontradas de que existe una variada gama de estrategias de apareamiento en las poblaciones estudiadas (monogamia, poligamia, poliandria, parasitismo de nido), en un siguiente paso se evalúa cuál de dichas estrategias produce mayores beneficios a los individuos en cuanto al número de descendientes

I. INTRODUCCIÓN

producidos. Para ello, se realiza un examen detallado del número de descendientes producidos bajo cada una de las estrategias de apareamiento existentes en la población. El análisis se realiza para los individuos de ambos sexos por separado, pues las presiones selectivas que afectan a cada sexo durante la reproducción son diferentes. Mediante esta aproximación se intenta comprender cómo se mantienen las diferentes estrategias de apareamiento en una misma población –algunas de ellas claramente opuestas en cuanto a intereses entre individuos del mismo sexo y del sexo opuesto– y bajo que circunstancias es ventajosa una u otra.

Con esta tesis, por lo tanto, espero aportar información útil para un mejor conocimiento y conservación del bisbita campestre, a la par que aumentar el conocimiento sobre la ecología reproductiva de las aves en general y, en particular, de las especies esteparias en latitudes mediterráneas.

II. METODOLOGÍA GENERAL

1. Especie de estudio

El bisbita campestre *Anthus campestris* (Linnaeus, 1758), pertenece a un amplio y cosmopolita género passeriformes que comprende otras 45 especies de especies insectívoras. Es un migrante transahariano que llega a las zonas de reproducción en España durante el mes de Abril y las abandona durante el mes de Septiembre. España también es un lugar de paso importante para las poblaciones europeas de la especie. Según Cramp y Simmons (2004) existe una gran fidelidad de los adultos a la zona de reproducción.

Su distribución durante la fase reproductora se extiende por latitudes templadas del Paleártico, desde el noroeste de África hasta Asia Central y China occidental. En Europa es más común en el este y a orillas del Mediterráneo (Hagemeijer y Blair 1997). A lo largo de su rango habita terrenos abiertos, llanos, secos y áridos pero no desérticos. Elige zonas con poca vegetación o vegetación dispersa de porte bajo.

La especie no está amenazada a nivel global (UICN: '*Least concern*') debido principalmente a que presenta un rango de distribución muy extenso, aunque su tendencia poblacional a nivel global no han sido evaluada recientemente y, por tanto, no se conoce con certeza. La información disponible señala que en Europa ha sufrido una disminución de alrededor del 20% de sus efectivos desde 1970 (Hagemeijer y Blair 1997), por lo que está considerada como "*en declive*". En Francia, por ejemplo, se ha detectado una disminución notable de sus poblaciones entre 1982 y 2002 (Fonderflick *et al.* 2010), y actualmente únicamente el 11,06 % de la población de bisbita campestre francesa se localiza en zonas de protección especial para las aves (SPAs) (Godet *et al.* 2007). En las estepas rusas de Transvolga parece que también ha disminuido su abundancia durante la segunda mitad del siglo XX, pasando de ser una especie común a escasa (Oparin 2008). En otras regiones europeas la especie ha llegando incluso a extinguirse recientemente, como es el caso de Bélgica y Holanda (Van Turnhout 2005). Sin embargo, hay poblaciones de bisbita campestre

estables en lugares como Polonia (Grzybek *et al.* 2008), Italia, Ucrania (Hagemeijer y Blair 1997) y la República Checa (Vašek Beran, *com pers*).

Según los datos del atlas climático de las aves reproductoras en Europa (Huntley *et al.* 2007), en un escenario futuro las poblaciones más amenazadas serían las del sur de su distribución, entre las que se encontrarían las poblaciones Españolas. Las poblaciones Españolas de la especie comprenden el 50 % de toda la población europea, con un tamaño estimado que varía entre 400.000 y 640.000 parejas reproductoras (Purroy 1997), o entre 673.000 y 1,164.000 (Carrascal y Palomino 2008).

La información disponible sobre tendencias poblacionales en España es parcial y fragmentada, con una tendencia media actual catalogada como *estable* (0.6% de variación) pero con diferencias entre poblaciones, desde incrementos recientes del 3.3% a disminuciones del 2.1%, según el último informe de SEO (BirdLife International 2010).

El conocimiento científico sobre la ecología y biología de la reproducción en esta especie es tremendamente limitado. A margen de los trabajos derivados de esta tesis, durante las dos últimas décadas únicamente se han publicado ocho trabajos relativos a la estructura del canto (Osiejuk *et al.* 2007), cambios en la masa corporal de las hembras durante la época reproductiva (Suárez *et al.* 2005a), un par de trabajos sobre las características del nido (Högestedt 1978; Suárez *et al.* 2005b), densidad de población (Van Turnhout 2005) y selección de hábitat (Brambilla y Rubolini 2005; Grzybek *et al.* 2008). Sólo hay información cuantitativa acerca de la biología reproductiva en estudios llevados a cabo sobre algunas poblaciones en los años 70 y 80 del siglo pasado (Högestedt 1978; Bijlsma 1978; Krüger 1989), y que han sido recopilados en Cramp (1998) y Del Hoyo *et al.* (2004). Estos pocos estudios han proporcionado la única información disponible sobre la historia natural del bisbita campestre de las zonas templadas del norte. Sin embargo, es probable que mucha de esta información ni siquiera sea de gran ayuda para la conservación futura de la especie, ya que muchos de los factores que afectaban entonces a las poblaciones de bisbita en Europa es posible que hayan cambiado profundamente

durante la última década. Este sería el caso de factores como la cantidad y calidad de hábitat disponible, alimento, depredadores y cambios climáticos (Donald *et al.* 2001; Crick 2004; Gordo y Sanz 2005).

La especie está considerada como '*esencialmente monógama*' (Del Hoyo *et al.* 2004) y sus pollos como nidícolas y semiprecociales (Cramp 1988). Se sabe que los pollos pueden permanecer en el nido hasta 14 días, aunque a menudo lo abandonan antes (Noval 1970). Una vez salen los pollos del nido aún no están capacitados para volar (cosa que tardan en conseguir una semana) ni alimentarse por sí solos, por lo que siguen siendo dependientes de los adultos hasta aproximadamente el mes de edad (Högstedt 1978). Instala sus nidos directamente en el suelo, por lo que es una especie que suele verse sometida a altas tasas de depredación, tal y como se ha descrito en varios estudios (Yanes y Suárez 1995, Cramp 1988)

2. Áreas de estudio

Los datos utilizados en esta tesis se obtuvieron en dos poblaciones de bisbita campestre situadas en los páramos del sistema ibérico: Los Páramos de Layna (Soria) y Los Llanos de las Valeras (Cuenca) (Figura II.1). Ambas zonas comparten sus principales características topográficas, presentando un relieve esencialmente llano, y fisionómicas, predominando la vegetación natural leñosa de bajo porte. Ambas zonas están clasificadas como “parameras ibéricas” según el Atlas de los Paisajes de España (Mata y Sanz, 2013). La presencia del bisbita campestre, así como de una amplia comunidad de aves esteparias reproductoras como la alondra ricoti (*Chersophilus duponti*) o la terrera marismeña (*Calandrella brachidactilla*) entre otras, hacen que ambas zonas estén incluidas en la Red Natura 2000 como Lugares de Interés Comunitario (LIC) y Zonas de Especial Interés para las Aves (ZEPA, Dir. 79/409/CEE): ES0000255 Páramo de Layna y ES0000160 Hoz del Río Gritos y Páramos de las Valeras. El impacto humano en ambas zonas se reduce al aprovechamiento ganadero extensivo a base de ovino, lo que ha permitido mantener una

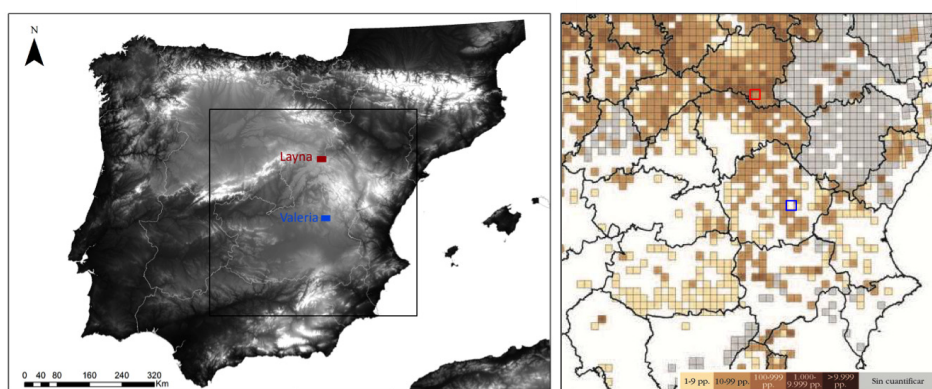


Figura II.1. A la izquierda se indica la localización de las dos zonas de estudio: Paramos de Layna (Layna, Soria) y Los llanos de las Valeras (Valeria, Cuenca). A la derecha se muestra la localización de las áreas de estudio (Layna en rojo y Valeria en azul) en el mapa de densidades de bisbita campestre según el Atlas de aves reproductoras de España (Martí y del Moral 2003).

cobertura arbustiva acorde con las necesidades de las aves esteparias.

En el Páramo de Layna (1.180 m a.s.l., 41°05' N, 2°19' W), llamado 'Layna' de aquí en adelante, la densidad de población reproductora de bisbita campestre es alta, de unas 18 a 24 parejas por km² (datos propios). Estructuralmente la vegetación forma un único estrato compuesto por caméfitos de porte almohadillado y por hemicriptófitos, dejando espacios de suelo descubierto (Figura II.2). Entre las especies leñosas predominan el cambrón (*Genista pumila*) y diferentes especies de tomillo (*Thymus zygis* y *T. loscosi*), así como espliego (*Lavandula angustifolia*), salvia (*Salvia officinalis*) y mejorana (*Origanum majorana*) en un paisaje salpicado con algunas sabinas negras (*Juniperus phoenicea*). En los sectores más pastoreados domina el pastizal de herbáceas anuales (*Brachypodium retusum*). Al ser el sustrato bastante pedregoso apenas existen unos pocos cultivos de cereal que ocupan el fondo de pequeñas vaguadas.

El clima es mediterráneo continental (Peinado y Rivas-Martínez 1987), con precipitaciones anuales de 500 mm y una media anual de temperaturas de 10.2 °C (temperatura media de enero: 0–2 °C; temperatura media de julio: 18–20 °C). La comunidad de potenciales depredadores de nidos en Layna ha sido parcialmente descrita por Suárez y colaboradores (Suárez *et al.* 1993) incluyendo especies como el perro (*Canis familiaris*), el zorro (*Vulpex vulpex*), el lirón careto (*Eliomys quercinus*), el lagarto ocelado (*Lacerta lepida*) y la víbora hocicuda (*Vipera latastei*) (Suarez *et al.* 1993). Además, son frecuentes en la zona otras especies que han sido detectadas depredando nidos (datos propios y datos aportados por Jorge Hernández Justribó, Jesús Herranz e Israel Hervás), como el aguilucho cenizo (*Circus pygargus*), el cernícalo vulgar (*Falco tinnunculus*) o la corneja negra (*Corvus corone*), y existe una variada comunidad de otras especies de depredadores potenciales, como la garduña (*Martes foina*), la comadreja (*Mustela nivalis*), el tejón (*Meles meles*), o el alcaudón común (*Lanius excubitor*).

La zona de los llanos de las Valeras (1,090 m a.s.l., 39° 48' N,

II. METODOLOGÍA GENERAL

2º 10' W), denominada 'Valeria' de aquí en adelante, mantienen una población reproductora de bisbita campestre algo menor que Layna, no sólo por encontrarse en menor densidad, 11 a 15 parejas/km², sino porque es una zona de vegetación natural aislada, rodeada por cultivos de cebada y girasol (Figuras II.3 y II.4). La zona está formada por mesetas tabulares y allanadas que circundan la hoz del río Gritos. Los páramos superiores se caracterizan por una vegetación caméfita de bajo porte y abierta donde predominan los aliagares (*Genista scorpius*) y romerales (*Rosmarinus officinalis*), con presencia en menor medida de cambrionales (*Genista pumila* subsp. *rigidissima*) y coscojares (*Quercus coccifera*). En estas zonas elevadas, existen pequeñas repoblaciones de pino negral (*Pinus nigra* subsp. *salzmanii*) realizadas en los años 60 y 70. En las zonas próximas a las tinadas para el ganado y otras zonas muy frecuentadas por el ganado aparecen majadales de *Poa bulbosa*, mientras que en las zonas menos pastoreadas aparecen lastonares (*Brachypodium retusum*). En las áreas pedregosas, donde domina la sabina negra (*Juniperus phoenicea*) se asientan los pastizales de *Stipa offneri*. El clima es marcadamente mediterráneo continental (Peinado y Rivas-Martínez 1987), con precipitaciones anuales de 750 mm y una media anual de temperaturas de 16 °C (temperatura media de enero: 4–6 °C; temperatura media de julio: 24–26 °C).

Dentro de cada una de las dos zonas se eligió un área de unas 200 ha para realizar el seguimiento intensivo de la reproducción del bisbita campestre. Durante esta tesis se han recogido datos de campo en 2007 en Layna y en 2008, 2009 y 2010 en Valeria. Además, se han utilizado los datos inéditos del Dr. Jesús Herranz sobre la reproducción del bisbita campestre en los años 2001 a 2005 en Layna ($n= 98$ nidos) y que se utilizan en los apartados III.1. *Descripción de los parámetros reproductivos* y III.3 *Fracasos durante la reproducción y depredación de nidos*.



Figura II.2. Paisaje típico del páramo de Layna (junio 2007)



Figura II.3. Paisaje típico de los Llanos de las Valeras (junio 2008)

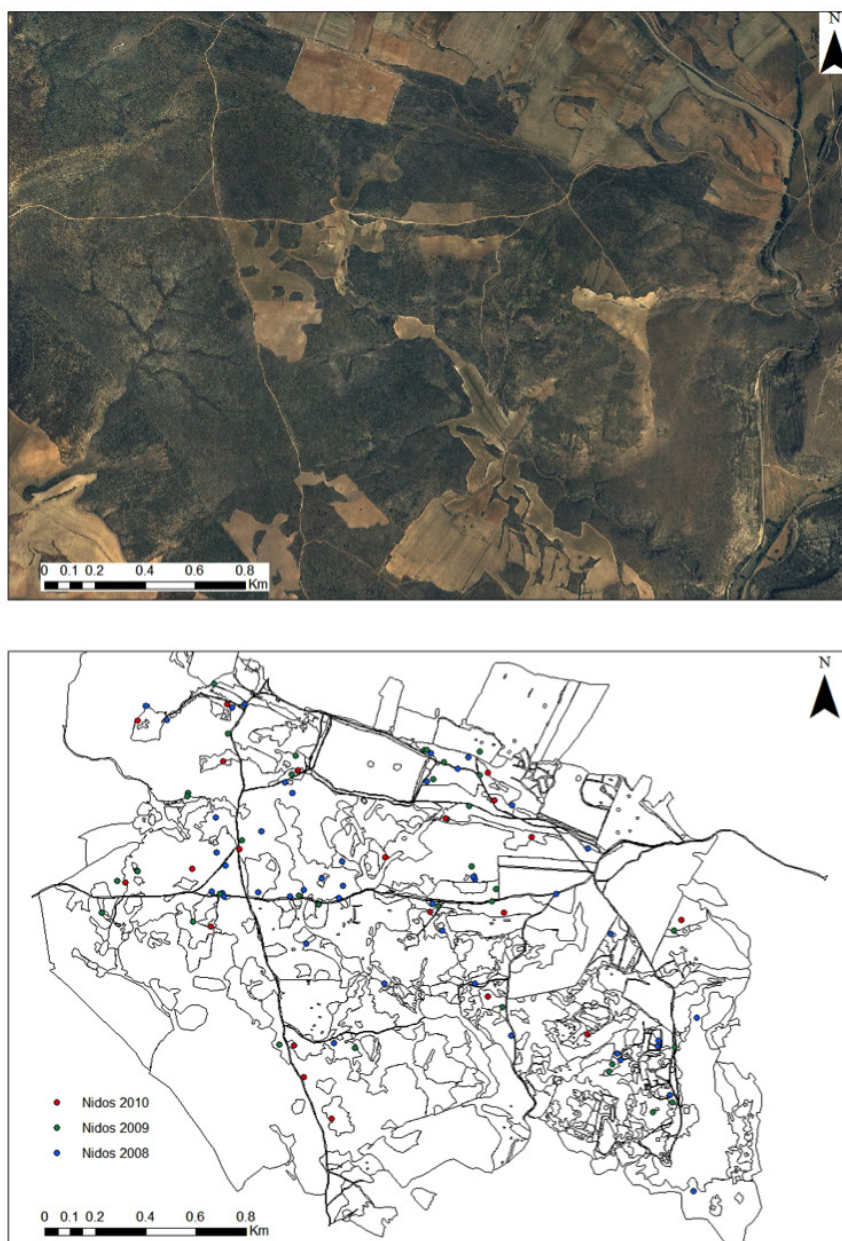


Figura II.4. La parte superior corresponde a la Ortofotografía de la zona de estudio de Valeria. En la parte inferior de la figura se ilustra la disposición de los nidos de bisbita campestre en la misma zona durante los años 2008 (azu), 2009 (verde) y 2010 (rojo) sobre un mapa donde se han cartografiado los polígonos con distinto tipo de vegetación.

3. Metodología del trabajo de campo

3.1. Seguimiento general de la reproducción y búsqueda de nidos

El seguimiento de la reproducción comenzó en cada año la última semana de marzo, antes de la llegada el primer individuo a las zonas de estudio, y se mantuvo de forma continua hasta finales de julio, momento en el que dejaron de encontrarse nuevos nidos y abandonaron el nido los pollos de los últimos nidos controlados. De este modo se cubrió toda la temporada de reproducción de la especie en estas latitudes (Tyler 2004). Durante este periodo, el trabajo de campo se centró principalmente en mapear la localización de individuos reproductores, en la búsqueda activa de nidos, la captura de adultos y en el seguimiento intensivo del contenido de los nidos localizados.

Los nidos se buscaron intensivamente y con el mismo esfuerzo largo de toda la temporada de cría cada año (media \pm desviación estándar: 93 ± 11 días/persona/año). En total, entre 2007 y 2010 se encontraron 111 nidos; 39 en Layna y 72 en Valeria (Tabla II.1, Figura II.4).

Los nidos se localizaron gracias a la observación del comportamiento de los adultos. Se utilizaron para ello diversos indicios, como la entrada de adultos con material en el pico durante la construcción del nido, salidas/entradas de la hembra durante la incubación y entradas al nido con alimento o salidas con bolas fecales durante la fase de crecimiento de los pollos. Se buscaron activamente, a lo largo de toda la temporada de reproducción, todos los nidos de los que hubo indicios de la existencia de adultos en actitud reproductora (machos en cantaderos, hembras establecidas en un territorio, comportamiento de guarda de la pareja por parte los machos, agresiones entre individuos, machos o hembras con material vegetal y/o alimento en el pico, reclamos de hembras de entrada al nido). Además, se realizó un importante esfuerzo para localizar nuevos nidos en las inmediaciones de nidos previamente fracasados. Durante el periodo de construcción del nido e incubación se localizaron 140

II. METODOLOGÍA GENERAL

nidos, mientras que otros 95 se localizaron durante el periodo de estancia de los pollos en el nido.

Una vez localizado el nido se registraron las coordenadas de su posición mediante GPS (error \pm 4 m.), y se indicó su situación con una varilla de madera a 2 m de su posición exacta con el fin de poder visualizar su contenido a cierta distancia o visitarlo con rapidez (Figura II.5).

Todos los nidos se visitaron regularmente cada 3-5 días, desde el momento de su localización hasta que los pollos salieron del nido o hasta que el nido fracasó. En cada visita se registró el contenido del nido (tamaño de puesta o tamaño de pollada) y se tomaron datos biométricos de los pollos, además de anotar la presencia/ausencia y el comportamiento de la hembra. Las visitas predeterminadas para la toma de muestras (sangre) de pollos, así como para la captura de las hembras, aparecen detalladas en los correspondientes apartados. Se intentaron minimizar las posibles perturbaciones y molestias causadas durante las visitas al nido, y se realizó un análisis para evaluar el posible efecto de las visitas sobre los fracasos durante la reproducción (apartado III.3 *Fracasos durante la reproducción y depredación de nidos*).

Población	Layna	Valeria			Total
		2008	2009	2010	
Año	2007	2008	2009	2010	
Machos adultos	31 (0)	33 (1)	23 (5)	14 (2)	101 (8)
Hembras adultas	36 (2)	19 (0)	22 (8)	15 (6)	92 (16)
Nidos	39	23	27	22	111
Pollos	119	78	102	74	373

Tabla II.1. Número total de machos y hembras adultas capturados, número de nidos seguidos y número de pollos marcados en esos nidos en cada año. Entre paréntesis se indica el número de adultos recapturados.

3.2. Estimación de la fecha de puesta

La fecha de puesta de cada nido es un parámetro clave para muchos de los objetivos de esta tesis, y aquí está considerada como la fecha de puesta del primer huevo en la puesta. Para el cálculo de este parámetro se ha tenido en cuenta que las hembras ponen a razón de un huevo cada 24 horas (Cramp 1998), que la incubación comienza con la puesta del último huevo, y que el tiempo de incubación es de 14 días, que es el valor modal para nuestras poblaciones (apartado III.1. *Descripción de los parámetros reproductivos*). La fecha de puesta se ha estimado mediante tres métodos diferentes:

- a) Observación directa, cuando el nido fue visitado cuando la puesta era aún incompleta ($n= 20$ nidos).
- b) Descontando 14 días de incubación a la fecha de eclosión, cuando ésta pudo ser determinada durante las visitas al nido ($n= 65$ nidos).
- c) Para los nidos encontrados durante el periodo de pollos y para los nidos en los que la fecha de eclosión no pudo ser determinada directamente, se utilizó la edad de los pollos para estimar la fecha de puesta ($n= 104$ nidos). Se utilizó un lote de pollos de edad conocida para elaborar curvas de crecimiento con un error estimado de ± 1 día (apartado II.3.3.5 *Estimación de la edad de los pollos*) a partir de las cuales estimar la fecha de puesta en los nidos en que este parámetro no se conocía, restando a la fecha de la visita en la que se tomaron los datos biométricos la edad de los pollos mas el tiempo de incubación.

En 57 nidos la fecha de puesta no pudo ser determinada directamente y los huevos no llegaron a eclosionar debido a depredación o abandono. A estos nidos se les asignó una fecha de puesta asumiendo que el nido fue encontrado cuando se encontraba en la mitad del periodo de incubación.

3.3. Captura, marcaje y procesado de adultos en la población

Se realizaron capturas de adultos, tanto de machos como de hembras, con el objeto de individualizarlos y recabar información sobre su biometría, coloración, estado de salud, parásitos, genética y parentesco. Se trató de capturar el mayor porcentaje posible de adultos en la población para poder realizar inferencias de nuestros resultados a nivel poblacional. Respecto a los machos, se realizaron capturas desde que se detectó la llegada de los primeros a la población y durante toda la temporada de reproducción en los territorios de cría, es decir, donde se observaron machos cantando en vuelo o en posaderos, o en actitud vigilante hacia una hembra (comportamiento de guarda de la pareja), o ejerciendo comportamientos agonísticos (persecuciones y enfrentamientos entre individuos). También se realizaron ensayos de captura a ciegas, sin indicios previos de la presencia de adultos, en lugares con hábitat aparentemente apropiado para la especie pero donde se observaban ‘huecos’ en el mapa de territorios.

Las capturas de machos se llevaron a cabo mediante el uso de cepos-malla (Figura II.6) cebados con gusanos de la miel (*Galleria melonella*), tenebrios (*Tenebrio molitor*) o zhopobas (*Zophoba morio*). Para atraer a los individuos a las inmediaciones de los cepos se utilizaron reclamos sonoros con reproducciones del canto y/o reclamos de alarma del bisbita campestre, obtenidos de la guía sonora de las aves de España (Roche 2002). Con esta metodología se capturaron un total de 98 machos y 4 hembras adultas (Tabla II.1), que también fueron atraídas a los cepos por el reclamo sonoro, bien de forma aislada o bien por estar junto a un macho. Pese a que este tipo de capturas de machos se intentaron durante toda la temporada reproducción, los machos mostraron mayor atención y un comportamiento mucho mas agresivo hacia los reclamos (y por tanto la tasa de capturas fue mas elevada) al principio de estación reproductora. Las capturas tuvieron lugar entre el 2 de mayo y el 3 de julio en Layna y entre el 24 de abril y el 1 de julio en Valeria, atendiendo a las diferencias de fenología entre ambas poblaciones (véase apartado III.1. *Descripción de los parámetros reproductivos*).

En el caso de las hembras, las capturas se realizaron mediante el empleo de una trampa-nasa colocada en el nido, que permite la entrada pero no la salida del individuo. El uso de la trampa se limitó a 30 minutos al día para evitar molestias excesivas en el nido (Suárez *et al.* 2005b). Con este método se trató de capturar a las hembras al cuidado de todos los nidos encontrados cada año en cada zona. Las capturas se realizaron siempre tras la eclosión de los huevos para evitar que la hembra abandone el nido, hecho que puede producirse si las capturas se realizan durante la incubación (J. Herranz, *com. pers.*). En ninguno de los eventos de captura realizados tras la eclosión de los huevos se detectó este hecho, continuando las hembras con la crianza de la prole en todos los casos. Con esta metodología se capturaron 88 hembras y 3 machos (Tabla II.I). Las capturas tuvieron lugar entre el 30 de mayo y el 30 de julio en Layna, y entre el 30 de mayo y el 12 de julio en Valeria.

Una vez capturado el individuo, tanto en el caso de los machos como de las hembras, éste se individualizó mediante la combinación de una anilla de metal y 3 anillas plásticas para su lectura a distancia (en posaderos o en el suelo), y se procedió a la toma de datos biométricos. Las medidas de la longitud del ala, la longitud de la octava primaria y la longitud de la cola se efectuaron con la ayuda de una regla de tope (0.5 mm de precisión). La longitud del tarso se efectuó con un calibre digital (0.01 mm de precisión) y el peso con una balanza digital (0.01 gramos de precisión).

Tras el registro biométrico se le extrajo a cada individuo una muestra de sangre de la vena yugular. Las muestras de sangre se conservaron en etanol al 99% hasta su procesamiento en el laboratorio. La captura y manipulación de los individuos se realizó con el permiso correspondiente de la Junta de Castilla-La Mancha, la Junta de Comunidad de Castilla y León, y de la Sociedad Española de Ornitología.



Figura II.5. Detalle de la estructura de la vegetación alrededor de un nido de bisbita. El nido aparece en la zona central de la fotografía al pie un romero (*Rosmarinum officinalis*). Se puede observar la varilla de madera que señala de forma discreta la posición del nido, situada en un matorral cercano (centro-derecha de la fotografía).



Figura II.6. Macho de bisbita campestre capturado con cepto malla.

3.4. Marcaje y procesado de los pollos

Todos los pollos fueron individualizados en la primera visita al nido para realizar un seguimiento detallado de su desarrollo. En los nidos encontrados durante las fases previas (puesta e incubación), se planificaron las visitas para que coincidiesen con el periodo de eclosión de los huevos y registrar así la fecha exacta de eclosión y el número de pollos nacidos. La intención, además, era la de registrar la mayor cantidad posible de fracasos tempranos tras la eclosión, momento en el que los pollos son mas vulnerables y el comportamiento de la hembra cambia, aumentando el numero de entradas y salidas del nido y, por tanto, aumentando la probabilidad de detección por parte de los depredadores. En los nidos encontrados una vez que los pollos habían eclosionado, éstos también se individualizaron para realizar su seguimiento a lo largo de la temporada.

La individualización de los pollos de una misma pollada en una primera fase (0 a 7 días) se llevó a cabo con una marca de color indeleble en las uñas del pollo (un color diferente para cada pollo de la pollada), que fue renovándose en las sucesivas visitas. En una segunda fase (desde los 7 días de vida hasta abandonar el nido o hasta el fracaso del mismo) los pollos fueron identificados mediante anillas metálicas y una combinación de colores, al igual que en el caso de los adultos (apartado *II.3.3. Captura, marcaje y procesado de adultos en la población*).

Se tomaron datos biométricos (longitud del ala, longitud de la octava primaria, longitud de cola y peso) de todos los pollos en cada visita al nido tras la eclosión, empleando la misma metodología descrita anteriormente en el caso de los adultos (Figura II.7).

Se obtuvo una primera muestra de sangre de cada pollo en la primera visita al nido, que consistió en una gota (2 microlitros) extraída de la vena yugular (vena grande y bien visible en esta fase ‘desplumada’ del desarrollo) con una jeringa de 0.5 mm. Esta muestra al nacimiento es importante para conocer el sexo y para los análisis de parentesco de la mayor parte de los pollos nacidos en la población, pues las altas tasas de depredación en nuestras poblaciones (apartado

II. METODOLOGÍA GENERAL

III.1. *Descripción de los parámetros reproductivos*) pueden producir la desaparición de muchos pollos a los pocos días de la eclosión. Con esta muestra, por tanto, se evita en la medida de lo posible desviaciones en los resultados por el posible efecto estacional de algunos factores ecológicos, como la depredación o la mortalidad dependiente del sexo. También es importante para acotar el momento de infección por parásitos a lo largo del desarrollo de los pollos. Durante la segunda fase del crecimiento (desde los 7 días hasta el momento de abandonar el nido) se tomó una segunda muestra de sangre a los pollos. En ningún caso se observaron daños causados a los pollos durante su procesado.



Figura II.7. Toma de datos de un pollo de bisbita campestre de 2 días de edad.

3.5. Estimación de la edad de los pollos

Para datar de una forma sencilla los pollos de edad desconocida (con fecha de eclosión desconocida) y los nidos cuya fecha de puesta no pudo ser calculada de forma directa, se utilizaron los datos biométricos de los pollos con fecha de eclosión –y, por tanto, edad– conocida. A partir de estos datos, se estudió la relación existente entre la edad de los pollos y la longitud del ala (en 84 individuos de edad conocida) y entre la edad de los pollos y la longitud de la octava primaria P_8 (en 92 individuos). Para ambos parámetros se construyeron sendos modelos de crecimiento de los pollos utilizando relaciones lineales, cuadráticas y cúbicas entre las variables. Tanto para la longitud del ala como para la longitud de la P_8 , se comprobó que el mejor ajuste biométrico con la edad estaba representado por una relación polinómica de grado 3 (Figura II.8) de la siguiente forma:

- Relación con la longitud del ala: [Edad = $6.742 - 2.398ala + 1.617ala^2 - 0.097ala^3$]
- Relación con la Octava primaria: [Edad = $1.035 - 3.286P_8 + 1.248P_8^2 - 0.066P_8^3$]

Ambas curvas proporcionan una información similar, y un ajuste con la edad del pollo de ± 1 día. Estas curvas de crecimiento de ala y la octava primaria nos permitieron datar los pollos y los nidos de forma rápida y sencilla, y poder planificar así las visitas a nidos en los momentos de interés para cubrir cada uno de los objetivos de esta tesis.

3.6. Estimación de la tasa de supervivencia diaria de los nidos

En distintos momentos a largo de esta tesis se utilizan estimas de éxito o fracaso de nidos referidos a momentos temporales (periodo de incubación, periodo de estancia de los pollos en el nido, etc.) en los que determinados factores ecológicos (depredación, por ejemplo) inciden en la población en mayor o menor medida. Estas estimas de

II. METODOLOGÍA GENERAL

nidos fracasados o con éxito se ofrecen en forma de tasas respecto al total de nidos encontrados y, por tanto, pueden presentar sesgos importantes debido a que no todos los nidos se encuentran al principio de la reproducción. En estudios sobre la reproducción basados en datos de nidos es común que los nidos que fracasan temprano pasen desapercibidos para el observador, estando la muestra de nidos utilizados sesgada hacia los nidos que han tenido éxito. Para corregir este efecto, se ha utilizado el método de Mayfield (Mayfield 1975) que tiene en cuenta en los cálculos el tiempo que cada nido está bajo observación, proporcionando una *tasa de supervivencia diaria (daily survival rates o DSR, en inglés)*. Esta tasa de supervivencia, con la formalización estadística propuesta por Johnson (Johnson 1979), se ha utilizado para analizar las tendencias estacionales en los fracasos totales durante la reproducción (apartado III.1. *Descripción de los parámetros reproductivos*).

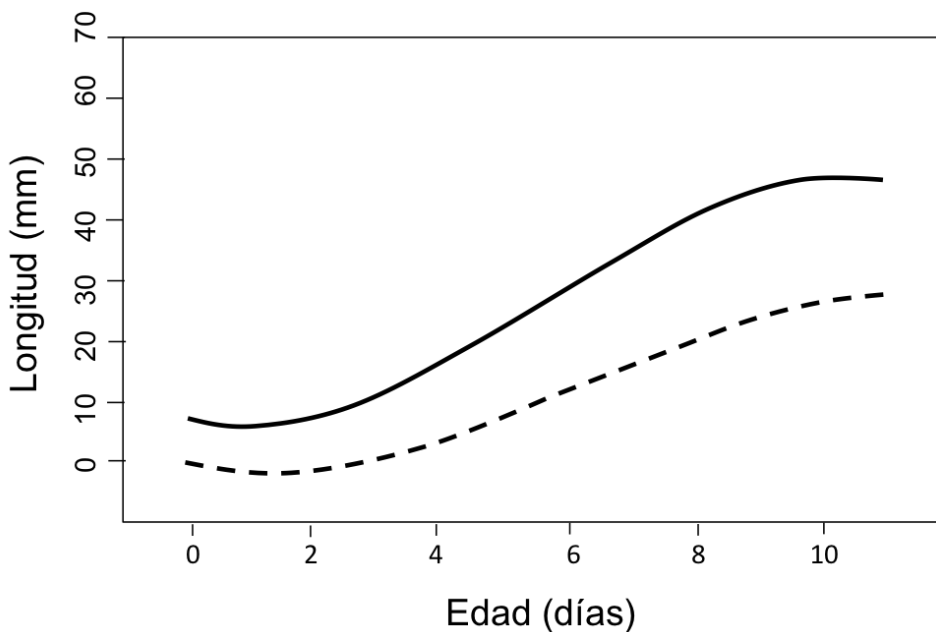


Figura II.8. Curvas de crecimiento de los pollos de bisbita campestre hasta que abandonan el nido. Se ilustra la relación entre la edad y la longitud del ala (línea continua) y la longitud de la octava primaria (línea discontinua).

4. Metodología de trabajo de Laboratorio

Todos los análisis moleculares se llevaron a cabo en el laboratorio de genética del Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC). Los métodos moleculares para tareas específicas llevadas a cabo en esta tesis, como la detección de parásitos sanguíneos, la creación de una librería de microsatélites y el genotipado de los bisbitas se detallan en los apartados correspondientes dentro de los bloques III y IV de esta tesis.

4.1. Extracción de ADN y sexado molecular

Se extrajo el ADN (ácido desoxirribonucleico) de todas las muestras de sangre que se recogieron en el campo, utilizando para ello un protocolo estándar de precipitación con sales de amonio y etanol. En todos los casos se comprobó la cantidad y calidad del ADN extraído mediante espectrofotometría UV/Vis (Nanodrop 2000), y se repitió la extracción cuando el resultado no fue satisfactorio. Todas las muestras se diluyeron a la misma concentración de trabajo (25 ng/μl).

De todas las muestras de sangre obtenidas (tanto de pollos como de adultos) se realizó un sexado molecular mediante la amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) del intrón del gen CHD1Z/W (Round *et al.* 2007). En cada PCR se incluyeron dos muestras de sexo conocido (un macho y una hembra) para verificar el correcto funcionamiento de la PCR y un negativo (ddH₂O) para controlar la presencia de posibles contaminaciones. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% con un volumen de muestra de 2.5 microlitros resultante de la PCR. Finalmente, el gel fue teñido con bromuro de etidio y las bandas de ADN visualizadas con el transiluminador para la determinación del sexo.

III. REPRODUCCIÓN, DEPREDACIÓN Y PARÁSITOS

Depredadores y parásitos son factores, junto con la disponibilidad de alimento, que habitualmente imponen severas limitaciones a la reproducción de las aves (Newton 1979). En muchas especies de aves la depredación es la mayor causa de pérdida de huevos y pollos durante la reproducción (véase, por ejemplo, Lack 1954, Ricklefs 1969, Martin 1991), llegando a afectar a una alta proporción de nidos a nivel poblacional (Martin 1993, 1995, Yanes y Suárez 1997). A nivel individual sus consecuencias se dejan sentir en el éxito reproductor y, por tanto, afectan a las estrategias vitales y tienen implicaciones evolutivas. Algunas especies de aves, no obstante, tienen la capacidad de realizar nuevas puestas tras sufrir la depredación en un primer nido, o incluso realizar varias puestas en una misma temporada de reproducción, lo que se traduce en un menor impacto de la depredación sobre el éxito reproductivo individual y poblacional (Pease y Grzybowski 1995, Nagy y Holmes 2004). La posibilidad de realizar dobles puestas o puestas de sustitución es un rasgo de las estrategias vitales bastante explotado por especies de vida corta (Stearns 1976, Newton 1989), que suelen ser propensas a priorizar la reproducción presente en detrimento de la futura para maximizar su éxito reproductivo.

Los parásitos, al igual que los depredadores, son también enemigos naturales de las aves pero cuya influencia sobre el hospedador puede mostrar un amplio rango de variación, desde producir la mortalidad de los individuos infectados hasta no producir efectos adversos aparentes (véase una revisión en Møller 1990). Durante la reproducción, los parásitos tienden a reducir el éxito reproductivo individual de los hospedadores y pueden, por tanto, constituir un importante agente selectivo (Poulin 2007). Además, durante esta fase del ciclo vital los parásitos pueden afectar no sólo a las aves adultas, sino también a los pollos, produciendo mortalidad directa o afectando a sus expectativas futuras de vida (Brown *et al.* 1995, Moller y Saino 2004). Tanto estudios teóricos como empíricos sugieren que los efectos de los parásitos sobre el éxito reproductivo pueden tener consecuencias importantes para la dinámica de los hospedadores (Hudson *et al.* 1998, Tompkins *et al.* 2002) y para la evolución de las estrategias vitales (Sheldon y Verhulst 1996, Agnew *et al.* 2000).

III. REPRODUCCIÓN, DEPREDACIÓN Y PARÁSITOS

En este bloque se analizan los parámetros reproductivos básicos de la especie (apartado III.1. *Descripción de los parámetros reproductivos*), el potencial para realizar dobles puestas y puestas de reposición (apartado III.2. *Dobles puestas y puestas de reposición*), la incidencia de la depredación en nidos durante los periodos de incubación y desarrollo de los pollos (apartado III.3. *Fracasos durante la reproducción y depredación de nidos*), y la prevalencia de parásitos sanguíneos del grupo de la malaria aviar, así como su impacto en adultos y pollos (apartado III. 4. *Parásitos sanguíneos: prevalencia y efecto en adultos y pollos*). Los datos utilizados han sido recopilados en las dos zonas de estudio (apartado II.1. *Áreas de estudio*) y los resultados que se presentan aquí se encuentran ya publicados o en trámite de publicación bajo los siguientes títulos:

- a) Breeding output and nest predation patterns in steppe-associated Mediterranean birds: the case of the Tawny Pipit *Anthus campestris*. Calero-Riestra, M., García, J.T., Herranz, J. y Suárez, F. 2013 *Journal of Ornithology*, 154: 289-298.
- b) ¿Dobles puestas o reposiciones? El caso del bisbita campestre (*Anthus campestris*). Calero-Riestra, M., García, J.T., Suárez, F. 2010. *XX Congreso Español de Ornitología, Tremp, Lleida*.
- c) Sex-dependent differences in avian malaria prevalence and consequences of infections on nestling growth and adult condition in the Tawny pipit, *Anthus campestris*. Calero-Riestra, M. y García, J.T. *Malaria Journal* (en revisión).

1. Descripción de los parámetros reproductivos

El objetivo principal de este trabajo es proporcionar los primeros datos sobre la reproducción del bisbita campestre *Anthus campestris* en ambientes mediterráneos. Para ello, se ha estudiado la reproducción de la especie en las dos zonas de estudio (apartado II.1. *Áreas de estudio*) mediante una búsqueda intensiva de nidos y un seguimiento continuado de los nidos a lo largo de toda la reproducción (apartado II.2. *Metodología de trabajo de campo*). Se han comparado los parámetros reproductivos (incluyendo fenología, tamaño de puesta, tamaño de pollada y éxito reproductivo) entre las dos áreas de estudio y entre diferentes años dentro de cada zona.

1.1. Datos utilizados y descripción de las variables

Se han utilizado datos de seis temporadas de reproducción (1991 a 1995 y 2007) en la población de Layna y de tres temporadas de reproducción (2008 a 2010) en la población de Valeria. La metodología general empleada para la búsqueda y el seguimiento de los nidos se encuentra detallada en el bloque II (apartado II.2.2. *Seguimiento general de la reproducción y búsqueda de nidos*)

Para cada nido se registraron las siguientes variables: (1) *fecha de puesta*, definida como aquélla en la que la hembra pone su primer huevo y relativizada al 1 de abril de cada año de estudio (véase apartado II.2.2. *Seguimiento general de la reproducción y búsqueda de nidos* para una descripción detallada de la estimación de fechas de puesta), (2) *tamaño de puesta*, definido como el número de huevos puestos, (3) *tamaño de pollada*, definido como el número de pollos que eclosionan y calculada sólo para nidos con éxito, (4) *tiempo de permanencia de los pollos en el nido*, definido como el tiempo transcurrido desde el nacimiento de los pollos hasta el momento de abandonar el nido (calculada sólo para nidos en los que se conocía con certeza la fecha de eclosión y la fecha de abandono del nido), (5) *número de pollos que vuelan*, definido como el número de pollos que llegaron a abandonar el nido, calculado sobre

nidos con éxito, y (6) *productividad*, como la media poblacional del número de pollos que llegaron a abandonar el nido, calculada sobre el total de eventos reproductivos de cada temporada.

1.2. Análisis estadísticos

La comparación de los parámetros reproductivos entre poblaciones se realizó mediante pruebas de la *t* de Student, mientras que para comprobar si existieron diferencias en el fracaso de nidos entre poblaciones (1= fracaso; 0= éxito) se utilizaron Modelos Lineales Generalizados (GLZ) con una distribución binomial del error y una función de vínculo logística. En los modelos GLZ se incluyó la variable P_{obs} como variable continua (Shaffer 2004).

Las variaciones entre años de los parámetros reproductivos se analizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA) para cada población por separado, puesto que el trabajo de campo se realizó durante diferentes años en cada zona de estudio y, por tanto, la interacción población-año no puede ser evaluada directamente. Para analizar la variación entre años en el fracaso de nidos se ajustó un modelo GLZ para cada población por separado, incluyendo como predictor la variable P_{obs} .

La variación estacional en el *tamaño de puesta*, *productividad*, *proporción de huevos no eclosionados* y *proporción de pollos no volados* se evaluó mediante Modelos Lineales Generales (GLM) con una distribución normal del error y una función de vínculo de identidad. Los cambios estacionales en los *fracasos durante la incubación* y *fracasos durante el periodo de desarrollo de los pollos* se evaluaron mediante GLZ con una distribución binomial del error y una función de vínculo logística. En estos modelos se incluyó como predictor la variable P_{obs} . También se incluyó en los modelos el término polinómico de la fecha de puesta como variable explicativa, para contemplar la posibilidad de que existiera una relación, lineal, cuadrática o cúbica en los patrones de variación estacional de los parámetros reproductivos (Schielzeth 2010). La fecha de puesta se estandarizó de forma separada para cada año, a fin de poder realizar comparaciones entre años y entre poblaciones. Las variables *tamaño de puesta* y *tamaño de pollada* se

incluyeron como explicativas en los análisis relativos a fracasos en incubación y fracasos durante la fase de pollos, respectivamente, ya que ambas podrían influir en la actividad de los progenitores y en los fracasos durante la reproducción (Martin *et al.* 2000).

Para evaluar si el seguimiento de los nidos realizado durante el trabajo de campo (influencia del observador) pudo tener alguna influencia en los fracasos durante la reproducción se construyeron modelos GLZ (con distribución binomial del error y función de vínculo logística) en los que se incluyó la *frecuencia* y la *duración de las visitas al nido* como predictores continuos, y el *número de visitas* como predictor categórico. También se incluyó el término polinómico de la *fecha de puesta*, P_{obs} y el *tamaño de puesta* como predictores adicionales. La importancia relativa de cada variable explicativa se evaluó mediante la partición de la devianza total del modelo entre las distintas variables.

Para los casos de hembras con dos eventos reproductivos en el mismo año se recalculó la productividad teniendo en cuenta ambos eventos.

Todos los resultados aparecen expresados como media \pm desviación estándar.

1.3. Resultados

1.3.1. Construcción del nido y fecha de puesta

El bisbita campestre llega a las áreas de reproducción estudiadas durante la primera (población de Valeria) o segunda semana de Abril (población de Layna). La construcción del nido dura entre 3 y 4 días ($n= 18$ nidos) y es llevada a cabo principalmente por las hembras (sólo 3 machos fueron observados aportando material para la construcción del nido de forma esporádica). Durante este periodo, los machos pasan la mayor parte del tiempo junto a la hembra, ocupados en la vigilancia y guarda de la pareja (*'mate guarding'*). El comportamiento de guarda de la pareja es muy patente durante esta fase, estando los machos muy cerca de las hembras y constantemente implicados en interacciones agresivas contra intrusos hasta que las hembras comienzan la incubación.

El inicio de la puesta fue más temprano en Valeria (12 de Mayo \pm 3 días) que en Layna (20 de Mayo \pm 6 días) y también el final de la puesta fue más temprano en Valeria (25 de Junio \pm 8 días) que en Layna (9 de Julio \pm 11 días). Se encontraron diferencias significativas en la fecha de puesta media entre ambas las localidades (Tabla III.1), siendo más tempranas en media las puestas de Valeria que las de Layna. Del mismo modo, el periodo durante el que se registraron las puestas fue más corto en la Valeria que en Layna (Figura III.1). Las variaciones entre años en la fecha de puesta fueron significativas en Valeria, pero no en Layna (Tabla III.1). Ambas poblaciones mostraron un primer pico de puestas durante la segunda mitad de Mayo y un pico mucho menos identificable a mitad de Junio (en Valeria) o a principios de Julio (en Layna) (Figura III.2).

1.3.2. Tamaño de puesta y tamaño de pollada

Las hembras pusieron los huevos a razón de uno cada 24 horas (datos calculados para 15 huevos de 6 nidos diferentes), comenzando la incubación con la puesta del último huevo. El periodo de incubación varió entre 13 y 15 días (media= 14 ± 0.48 días, moda= 14 días, $n= 7$ nidos) y el tamaño medio de puesta fue de 4.19 ± 0.74 huevos (rango= 1-5 huevos, moda= 4 huevos, $n= 235$ nidos). Los nidos con menos de tres huevos fueron escasos (2.5 % de los nidos). No se encontraron diferencias significativas en el tamaño de puesta entre poblaciones (Tabla III.1). La variación entre años para el tamaño de puesta fue significativa en Layna pero no en Valeria (Tabla III.1) y los análisis *a posteriori* revelaron que las diferencias en Layna se deben a los años 1992 y 1994 (test de Tukey: $p= 0.03$), siendo todas las demás comparaciones por pares no significativas ($p > 0.1$).

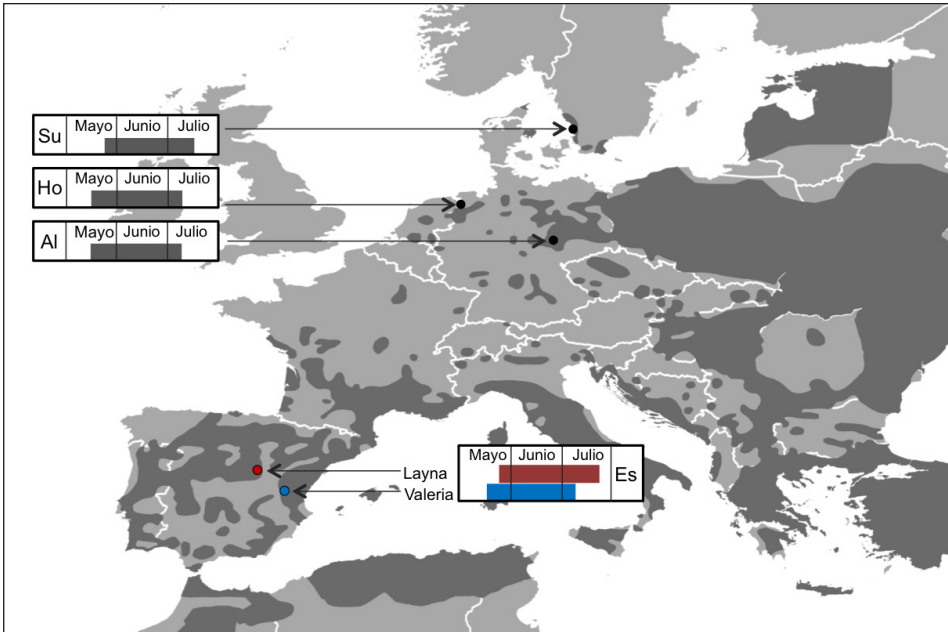


Figura III.1. Distribución del bisbita campestre en la época reproductora (gris oscuro) según BirdLife International y NatureServe (2011). Las poblaciones en las que se conoce la duración del periodo reproductivo están indicadas en el mapa: Suecia (Su), Alemania (Al), Holanda (Ho) y las dos poblaciones del centro de España incluidas en esta tesis.

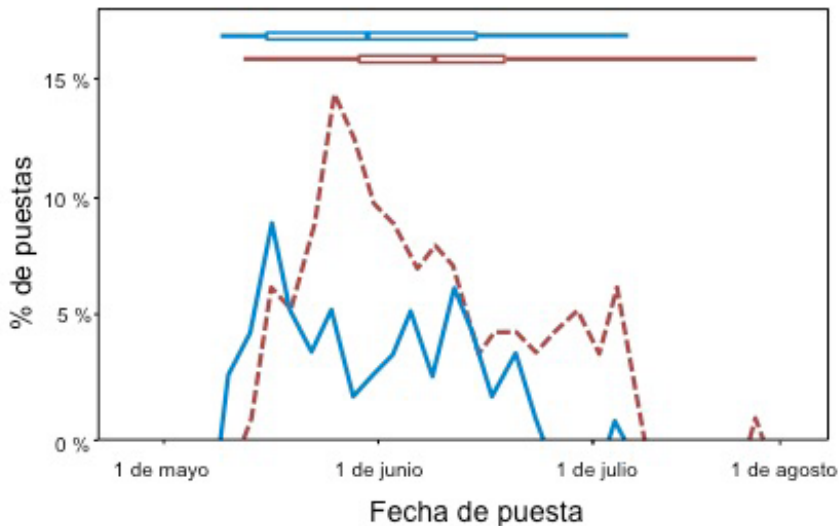


Figura III.2. Distribución de las puestas a lo largo del periodo reproductivo en las dos poblaciones de estudio: Valeria (línea azul) y Layna (línea roja). En la parte superior se representa la duración total del periodo, la media y el valor del primer y tercer cuartil para cada población.

III. REPRODUCCIÓN, DEPREDACIÓN Y PARÁSITOS

	N	Fecha de Puesta	Tamaño de puesta	HNE	Tamaño de pollada	PNV	Pollos volados	Productividad
<i>Población de Layna</i>								
1991	23	6 Junio ±10	4.39 ±0.78	0.14 ±0.17	3.93 ±0.96	0.11 ±0.21	3.60 ±1.00	1.56 ±0.38
1992	25	7 Junio ±20	4.44 ±0.65	0.09 ±0.15	4.14 ±0.77	0.00 ±0.00	3.83 ±0.75	0.91 ±0.37
1993	15	10 Junio ±12	4.20 ±0.68	0.04 ±0.12	4.00 ±0.77	0.00 ±0.00	3.83 ±0.75	1.53 ±0.47
1994	22	12 Junio ±12	3.82 ±0.85	0.04 ±0.09	4.00 ±0.71	0.00 ±0.00	3.75 ±0.50	0.72 ±0.39
1995	39	9 Junio ±15	4.10 ±0.64	0.07 ±0.14	3.78 ±0.69	0.03 ±0.09	3.68 ±0.78	2.07 ±0.29
2007	39	4 Junio ±17	4.17 ±0.67	0.09 ±0.15	3.74 ±0.89	0.05 ±0.12	3.61 ±0.99	2.58 ±0.29
Total	163	8 Junio ±15	4.18 ±0.72	0.08 ±0.14	3.88 ±0.80	0.04 ±0.12	3.67 ±0.88	1.68 ±0.15
Diferencias entre años		$F_{5,157} = 0.89$ $p = 0.48$	$F_{5,157} = 2.36$ $p = 0.04$	$F_{5,106} = 0.97$ $p = 0.44$	$F_{5,106} = 0.67$ $p = 0.64$	$F_{5,70} = 1.07$ $p = 0.39$	$F_{5,70} = 0.12$ $p = 0.99$	$F_{3,156} = 4.31$ $p = 0.001$
<i>Población de Valeria</i>								
2008	23	1 Junio ±12	4.33 ±0.87	0.03 ±0.10	4.10 ±0.99	0.14 ±0.21	3.36 ±1.28	2.05 ±0.42
2009	27	24 Mayo ±15	4.15 ±0.78	0.03 ±0.08	4.04 ±0.84	0.08 ±0.16	3.75 ±1.21	1.74 ±0.40
2010	22	1 Junio ±14	4.23 ±0.68	0.06 ±0.11	3.89 ±0.81	0.09 ±0.24	3.73 ±1.10	1.84 ±0.43
Total	72	29 Mayo ±14	4.22 ±0.78	0.04 ±0.10	4.01 ±0.87	0.11 ±0.20	3.59 ±1.19	1.94 ±0.23
Diferencias entre años		$F_{2,69} = 3.52$ $p = 0.03$	$F_{2,68} = 0.22$ $p = 0.80$	$F_{2,60} = 0.75$ $p = 0.48$	$F_{2,60} = 0.29$ $p = 0.75$	$F_{2,34} = 0.33$ $p = 0.72$	$F_{2,60} = 0.43$ $p = 0.65$	$F_{2,67} = 0.15$ $p = 0.86$
Diferencias entre poblaciones		$t_{233} = 4.46$ $p < 0.001$	$t_{232} = 0.45$ $p = 0.65$	$t_{173} = 1.98$ $p = 0.05$	$t_{73} = 1.01$ $p = 0.31$	$t_{111} = 2.13$ $p = 0.03$	$t_{111} = 0.38$ $p = 0.70$	$t_{231} = 0.67$ $p = 0.50$

Tabla III.1. Parámetros reproductivos anuales (expresados como valor medio±sd) en el bisbita campestre en las dos zonas de estudio. Se muestran los valores del estadístico de Fischer (F') y la significación (p) de las pruebas de análisis de la varianza (ANOVA) ...

III. REPRODUCCIÓN, DEPREDACIÓN Y PARÁSITOS

entre años, y el estadístico de la t de Student (t) y su significación (p) para las diferencias entre poblaciones. En negrita aparecen los resultados significativos para ambas pruebas. (N = número de nidos; HNE = proporción de huevos no eclosionados; PNV = proporción de pollos no volados).

Las puestas más grandes se encontraron durante la primera parte del periodo reproductivo en ambas poblaciones (Figura III.3), como revela la relación significativa y negativa entre el tamaño de puesta y la fecha de puesta (término cuadrático; Tabla III.2). No se encontró ninguna relación significativa entre el tamaño de puesta y los términos lineal o cúbico de la fecha de puesta (Tabla III.2).

El tamaño de la pollada fue ligeramente menor que el tamaño de puesta (Tabla III.1 y Figura III.3). Esta variable no difirió significativamente entre poblaciones, pese a que se observaron valores ligeramente menores en Layna que en Valeria, ni entre años dentro de cada población.

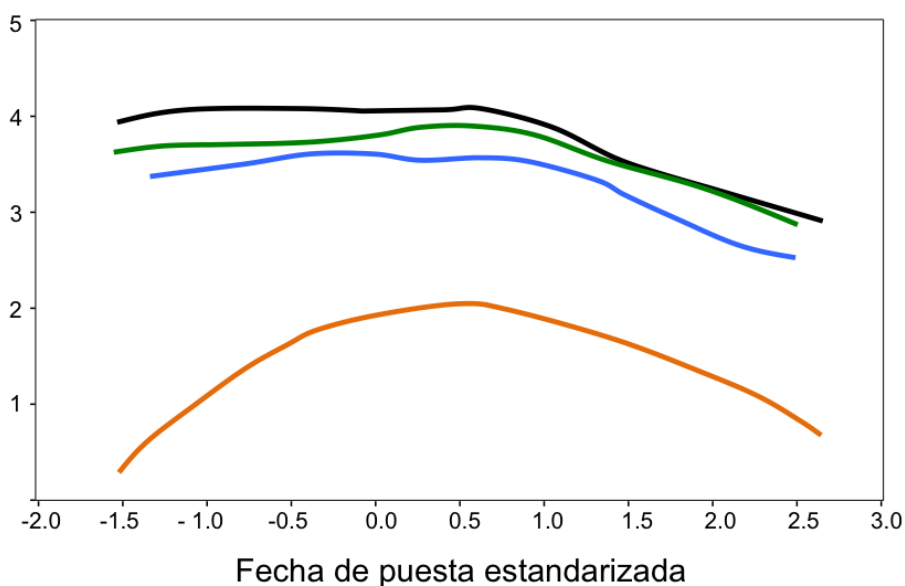


Figura III.3. Variación estacional del tamaño medio de puesta (línea negra), tamaño de pollada (línea verde), media de pollos volados por nido (línea azul) y productividad (línea naranja) para las poblaciones de estudio en España.

Predictores	Tamaño de puesta	Fracasos en incubación		Fracasos en fase de pollos		Productividad
		Completo	HNE	Completo	PNV	
<i>Fecha de puesta</i>	$F_{1,230} = 2.42$ $p = 0.12$	$W_{1,134} = 1.10$ $p = 0.29$	$F_{1,76} = 1.96$ $p = 0.16$	$W_{1,168} = 0.01$ $p = 0.91$	$F_{1,108} = 0.57$ $p = 0.45$	$F_{1,167} = 0.03$ $p = 0.86$
<i>Fecha de puesta</i> ²	$F_{1,230} = 4.98$ $p = 0.03$	$W_{1,134} = 0.14$ $p = 0.71$	$F_{1,76} = 0.39$ $p = 0.53$	$W_{1,168} = 4.28$ $p = 0.03$	$F_{1,108} = 0.02$ $p = 0.87$	$F_{1,167} = 5.93$ $p = 0.02$
<i>Fecha de puesta</i> ³	$F_{1,230} = 0.02$ $p = 0.90$	$W_{1,134} = 0.68$ $p = 0.41$	$F_{1,76} = 0.05$ $p = 0.81$	$F_{1,168} = 2.84$ $p = 0.09$	$F_{1,108} = 0.45$ $p = 0.50$	$F_{1,167} = 2.49$ $p = 0.12$
P_{Obs}		$W_{1,134} = 4.54$ $p = 0.03$		$W_{1,135} = 21.72$ $p < 0.001$		$F_{1,167} = 0.33$ $p = 0.56$
<i>Tamaño de puesta</i>		$W_{1,135} = 3.49$ $p = 0.06$	$F_{1,76} = 0.65$ $p = 0.42$			$F_{1,167} = 0.10$ $p = 0.75$
<i>Tamaño de pollada</i>				$W_{1,168} = 0.08$ $p = 0.77$	$F_{1,108} = 0.71$ $p = 0.40$	$F_{1,167} = 3.49$ $p = 0.06$

Tabla III.2. Resultados de los análisis multivariantes realizados para explorar la variación estacional (términos lineal, cuadrático y cubico de la fecha de puesta) del tamaño de puesta, fracasos durante la incubación y fase de pollos en el nido (tanto perdidas completas como parciales) y de la productividad del bisbita campestre. Se muestran los valores del estadístico de Fischer (F) y la significación (p) de los modelos lineales generales (GLM) y el estadístico de Wald (W) y su significación (p) de los modelos binomiales (GLZ). (P_{Obs} = periodo durante el cual el nido está bajo observación; HNE= proporción de huevos no eclosionados; PNV= proporción de pollos no volados).

1.3.3. Productividad y periodo de estancia de los pollos en el nido

El periodo medio de estancia de los pollos en el nido fue de 10.8 ± 1.3 días (rango de 7-14 días, moda= 11; $n= 113$ nidos), tras el cual los pollos abandonan el nido y se refugian en arbustos cercanos, donde continúan siendo cebados de forma individual y desde donde se van desplazando progresivamente a zonas mas alejadas del emplazamiento original del nido. Debido a este desplazamiento continuo, durante este periodo se hace ya muy difícil seguir la actividad de padres y pollos de forma individualizada, ya que en ocasiones se confunden con los pollos y padres de nidos cercanos. Debido a esto, la duración del periodo desde el abandono del nido hasta la independencia no se ha podido determinar con exactitud, aunque las observaciones realizadas sugieren una duración mínima de 12-15 días.

La alimentación de los pollos durante el periodo de estancia en el nido es llevada a cabo exclusivamente por las hembras; los machos cooperan sólo de forma esporádica (únicamente en 3 de los 112 nidos examinados durante este periodo se capturó un macho entrando a cebar al nido).

La productividad del bisbita campestre es de 1.75 ± 1.95 pollos por nido (rango= 0-5, valor modal= 0 pollos, $n= 234$), mientras que en el número de pollos que vuelan es de 3.64 ± 0.99 pollos por nido (rango= 1-5, valor modal= 4 pollos, $n= 113$). La productividad varió de forma significativa a lo largo de la estación reproductora (Tabla III.2), siendo mayor hacia la mitad de la reproducción que al principio o al final de la misma (Figura III.3). Después de considerar la duración del periodo durante el cual el nido está bajo observación (P_{obs}), ni el tamaño de puesta ni el tamaño de pollada influyeron significativamente en la productividad (Tabla III.2). La productividad fue similar en ambas poblaciones y únicamente se detectaron diferencias significativas entre años en Layna pero no en Valeria (Tabla III.1). Estas diferencias son debidas, principalmente, a la alta productividad registrada en 2007 en comparación a 1992 y 1994 (Tukey $p < 0.01$) y 1994-1995 ($p= 0.04$).

2. Dobles puestas y puestas de reposición

En las especies de aves que se reproducen más de una vez al año, el número de eventos de reproducción es uno de los principales determinantes del éxito reproductor (Lack 1954, Newton 1989). En latitudes templadas, donde las condiciones respecto a disponibilidad de alimento y duración del periodo reproductor son adecuadas, numerosas especies de aves realizan mas de una puesta por temporada de reproducción. Este comportamiento puede ser muy ventajoso en especies de aves que construyen sus nidos en el suelo, pues las altas tasas de depredación a la que se ven sometidos frecuentemente sus nidos suelen provocar un descenso en la productividad que podría ser parcialmente compensado gracias a la posibilidad de realizar múltiples puestas (puesta de reposición tras un fracaso y dobles puestas) (Pease y Grzybowski 1995, Nagy y Holmes 2004).

Las características concretas y la importancia para la reproducción de este tipo de comportamiento se desconocen en el bisbita campestre, aunque existen indicios para pensar que la especie es capaz de realizar dobles puestas (Del Hoyo *et al.* 1994). Estos indicios se basan en la frecuencia de distribución de las puestas a lo largo de la temporada de reproducción. Al igual que muchos otros passeriformes esteparios, la especie muestra una distribución bimodal en la fecha de puesta (Figura III.2), cuyo segundo pico ha sido atribuido tradicionalmente a las dobles puestas (Del Hoyo *et al.* 1994).

No obstante, las limitaciones a las que debe hacer frente la especie durante la reproducción, como las fechas fijas de migración, altas tasas de depredación y ausencia de cuidado parental por parte del macho (apartado III.1. *Descripción de los parámetros reproductivos*) sugieren que el patrón bimodal en la fecha de puesta de esta especie podría estar asociado a las puestas de reposición (segundo intento de cría tras el fracaso de la primera puesta) antes que a la existencia de dobles puestas.

Este trabajo está enfocado a (i) determinar la existencia o no de dobles puestas en nuestras poblaciones de estudio, (ii) cuantificar

este comportamiento en las poblaciones, (iii) examinar su relación con el momento de la reproducción en que se producen, (iv) examinar el efecto de este comportamiento en el éxito reproductivo de la especie.

2.1. Metodología

Entre 2007 y 2010 realizamos un seguimiento intensivo de la reproducción en las dos poblaciones de bisbita campestre (apartado II.2.1 *Seguimiento general de la reproducción y búsqueda de nidos*). Todas las hembras fueron capturadas en el nido con una trampa nasa e individualizadas con anillas de colores para detectar posteriormente los casos de segundas puestas o puestas de reposición. Para cada nido se calculó la fecha de puesta, así como el número de huevos puestos, los pollos eclosionados y su supervivencia. Se calculó el tiempo medio de duración de las distintas fases de la reproducción sobre los nidos en los que se realizó un seguimiento completo.

Se consideraron *dobles puestas* cuando la misma hembra fue capturada en un segundo nido cuando alimentaba a los pollos, habiendo sido exitoso el primer nido; se consideraron *puestas de reposición* cuando la misma hembra fue capturada en un segundo nido mientras alimentaba a los pollos, habiendo fracasado su primer nido. Se calculó la proporción real de cada uno de los tipos de nidos para cada año. También se calculó la proporción potencial de hembras que podrían tener varios eventos reproductores en una misma temporada de cría. Para ello, cada hembra se codificó como (i) *hembra con posibilidades de realizar una puesta de reposición*, (ii) *hembra con posibilidades de realizar una segunda puesta*, o (iii) *hembra sin posibilidad de realizar un segundo puesta*. En esta clasificación se asumió que todas las hembras podrían realizar dos puestas en caso de que fuera posible, por lo que las estimas que aportamos son máximas. El potencial de reproducirse dos veces en la misma temporada se calculó teniendo en cuenta diferentes factores: a) *duración de la temporada de reproducción*, considerado como el periodo que incluyó todos los nidos de la población, b) *tiempo requerido para producir una puesta con éxito*, c) *intervalo de tiempo entre puesta y puesta*, d) *distribución anual de las puestas* y e) *probabilidad de*

fracaso de la puesta. La proporción de hembras que podrían realizar una puesta de reposición se calculó como la proporción de nidos fracasados con tiempo suficiente para realizar otra puesta y sacar adelante a los pollos, mientras que la proporción de hembras que podían realizar una segunda puesta se calculó como la proporción de nidos con éxito en los que habría tiempo para volver a reproducirse con éxito.

La relación entre estas variables con las dependientes (probabilidad de segunda puesta o probabilidad de puesta de reposición) se evaluó mediante regresiones logísticas.

2.2. Resultados y discusión

La proporción de puestas de reposición encontradas en ambas poblaciones es baja, suponiendo aproximadamente el 17% ($n= 6$) del total de puestas en Valeria y el 4% ($n= 1$) en Layna. Respecto a las dobles puestas, sólo se tuvo certeza de un caso en Layna (3,8 %). El resto de las puestas encontradas durante la segunda parte de la reproducción, y que se corresponden con el segundo pico en la distribución bimodal de las fechas de puesta (Figura III.2) fueron realizadas por hembras no marcadas previamente.

Los siete casos de ‘segundos nidos’ fueron encontrados en un rango de entre 43 y 215 metros de los primeros nidos (media de 114.8 ± 62.8 m). En el caso de la segunda puesta, el nido se halló a 66 m de distancia del primero, mientras que las puestas de reposición se encontraron a una distancia media de 122 ± 64 m. Una vez que el primer nido hubo fracasado, los bisbitas emplearon 8.4 ± 7.3 días en comenzar la puesta de reposición. Cuatro de las 7 puestas de reposición encontradas (67.6%) tuvieron éxito y produjeron 3.5 ± 1.7 pollos. Sin embargo, y a pesar de que estas hembras con puestas de reposición pusieron un total de 8.3 ± 1.11 huevos de media, la productividad final media fue de 2.2 ± 2.13 pollos por hembra.

En el caso de la doble puesta detectada, ésta se realizó 15 días después de que los pollos del primer nido hubiesen abandonado el nido con éxito. Esta hembra puso un total de 7 huevos (4+3) y obtuvo una productividad final de 5 pollos.

La probabilidad de realizar una puesta de reposición se relacionó de forma significativa con la fecha de puesta del primer nido y con la fecha de fracaso del nido (Logit $\chi^2=11.96$, $p= 0.002$; Figura III.4). Dicha probabilidad es mayor cuanto antes se realice la primera puesta y cuanto antes fracase el nido, indicando una limitación temporal importante a la hora de realizar puestas de reposición.

Teniendo en cuenta la duración de las distintas tareas (construcción del nido, realización de la puesta, incubación, estancia de los pollos en el nido), el tiempo necesario para lograr llevar a término una primera puesta (4 ó 5 huevos) comprenden un mínimo de 33-35 días. Teniendo en cuenta este intervalo de tiempo, y considerando la duración de la estación reproductora en cada una de nuestras poblaciones, podemos observar que únicamente las hembras que realicen la primera puesta durante los 8 primeros días (en Layna) o los primeros 2 días (Valeria) tendrían tiempo suficiente para realizar una segunda puesta y sacar la pollada con éxito. Por lo tanto, no parece evidente que el segundo

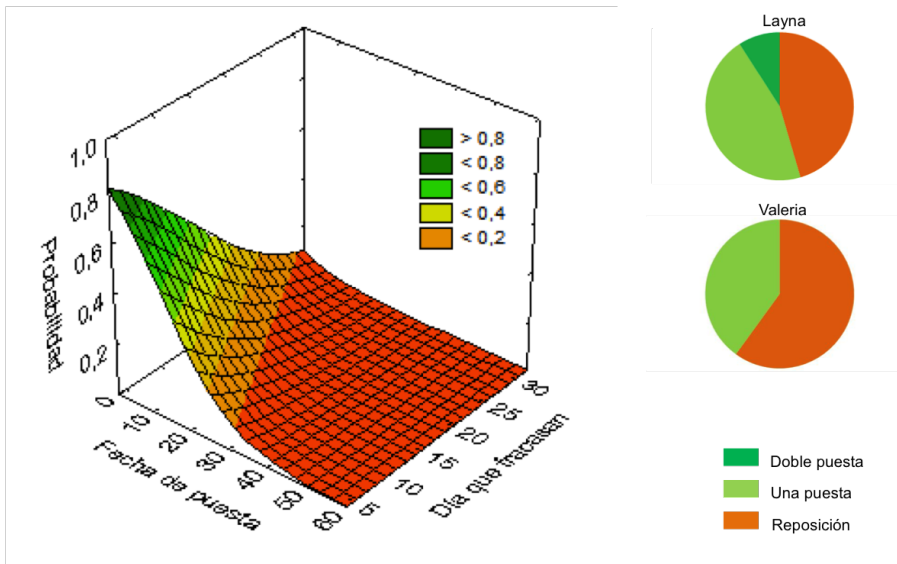


Figura III.4. A la izquierda se ilustra la probabilidad de realizar puestas de reposición (eje ordenadas) en función de la fecha de primera puesta (eje abscisas) y de la fecha en la que fracasan los nidos (eje cotas). A la derecha se muestra, en sendos diagramas circulares, el porcentaje estimado de hembras que podrían realizar una sola puesta, dos puestas, y puestas de reposición, en función de la fecha de primera puesta y de los fracasos durante la reproducción.

pico en la distribución de la fecha de puesta corresponda con dobles o segundas puestas, al menos en nuestras poblaciones de estudio. Además, podemos observar que el intervalo de tiempo existente entre los dos picos observados en la distribución de las puestas a lo largo de la reproducción (Figura III.2) es demasiado corto (35 y 23 días para Layna y Valeria, respectivamente) para permitir dobles puestas.

Parece claro que debido a las limitaciones temporales y a la alta tasa de pérdidas de nidos en la especie las dobles puestas son muy infrecuentes en las poblaciones de bisbitas campestre estudiadas, mientras que es esperable una alta frecuencia de puestas de reposición. Por lo tanto, lo más probable es que el segundo pico observado en la frecuencia de puestas en esta especie se corresponda con puestas de reposición o simplemente con eventos tardíos de cría. En todo caso, si la frecuencia de dobles puestas es menor de lo que se pensaba, las consecuencias para la viabilidad de muchas poblaciones de bisbita campestre puede verse comprometida a medio y largo plazo, por lo que sería interesante investigar este comportamiento en otras poblaciones ibéricas y en poblaciones del centro y norte de Europa, donde la especie está sufriendo disminuciones notables en diversas poblaciones.

3. Fracasos durante la reproducción y depredación de nidos

3.1. Metodología

Para analizar las tendencias estacionales en los fracasos totales durante la reproducción (pérdida de puesta o pollada completa), se clasificó cada nido como *fracasado* (1) o *con éxito* (0). Se distinguió entre *fracasos durante la incubación* y *fracasos durante el periodo de desarrollo de los pollos*. Se asumió que los nidos tuvieron éxito cuando se confirmó, mediante observación directa, que los pollos habían abandonado ya el nido (normalmente entre los 9 y 11 días de edad) o si se detectó a los adultos cebando a los pollos fuera del nido. Cuando tras una búsqueda exhaustiva no se obtuvo ninguna de estas evidencias, se asumió que el nido había fracasado.

Además, evaluamos las pérdidas parciales en nidos que tuvieron éxito mediante la *proporción de huevos no eclosionados* respecto del tamaño de puesta y la *proporción de pollos no volados* respecto al tamaño de pollada.

Las causas de fracasos en nido se clasificaron como *depredación*, *deserción de la hembra/inanición*, o *causa desconocida*. Los nidos encontrados vacíos durante alguna visita –o con evidentes signos de haber sido depredado– antes de la fecha esperada de eclosión o salida del nido por parte de los pollos, fue considerado como depredado. Por otra parte, se consideró que la hembra había abandonado el nido cuando no fue detectada durante uno o mas días consecutivos y, consecuentemente, los huevos nunca eclosionaron o los pollos murieron en el nido por inanición.

Finalmente, para cada nido se calculó la variable *tiempo durante el cual el nido está bajo observación* (P_{obs}) y la *tasa de supervivencia diaria* (DSR, Mayfield 1975) tanto para el periodo de incubación como para el periodo de estancia de los pollos en el nido según lo descrito en el bloque II (apartado II.2.6. *Estimación de la tasa de supervivencia de los nidos*).

3.2. Resultados

En el total de las puestas analizadas ($n= 140$), 279 de los 569 huevos no llegaron a eclosionar, lo que supone un 46.9% de pérdidas durante el periodo de incubación. En el 87% de los casos se registraron pérdidas completas, de toda la puesta, mientras que sólo el 13% de los huevos no eclosionados se debieron a pérdidas parciales. Sumando ambos tipos de pérdidas, globalmente se detectaron fracasos durante la incubación en el 42% de los nidos encontrados. Las causas principales del fracaso durante este periodo fueron la depredación (85% de los casos), el abandono de la puesta por parte de la hembra (13%) y otras causas minoritarias (2%). Depredación parcial durante este periodo se detectó sólo en dos puestas, con el consiguiente abandono de la puesta por parte de la hembra.

La probabilidad mínima y máxima de fracaso de la puesta (probabilidad de Mayfield, véase apartado II.2.6. *Estimación de la tasa de supervivencia diaria de los nidos*) fue del 48.3 y 67.3% respectivamente (tasa de supervivencia diaria; $RSD_{incubación} = 0.938 \pm 0.008$). Los fracasos durante la incubación fueron similares en ambas poblaciones ($W= 0.66$, $p= 0.42$; Figura III.5) y entre años dentro de cada población (Layna: $W= 1.51$, $p= 0.91$; Valeria: $W= 2.21$, $p= 0.33$). No se detectó relación significativa entre los fracasos durante la incubación y la fecha de puesta, por lo que no parece existir un claro patrón estacional en los fracasos durante este periodo (Tabla III.2). Tampoco se detectó relación significativa entre la probabilidad de fracaso durante la incubación y el tamaño de la puesta (Tabla III.2), pese a que las puestas de menor tamaño mostraron una mayor tendencia a fracasar que las puestas mas grandes.

Se detectaron fracasos de eclosión en el 33% ($n= 81$) de los nidos que llegaron activos a esta fase. El número de huevos sin eclosionar por nido fue de uno (71.6% de los casos) o dos (28.6% de los casos), lo que representa una media poblacional de 0.10 ± 0.15 huevos sin eclosionar por puesta. Las diferencias entre zonas de estudio respecto a la proporción de huevos no eclosionados fueron marginalmente significativas, con valores superiores en Layna que en Valeria (Tabla

III.1). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre años para este parámetro en ninguna de las dos poblaciones (Tabla III.1). Finalmente, la proporción de huevos no eclosionados no mostró relación significativa con el tamaño o la fecha de puesta (Tabla III.2).

Respecto a las pérdidas durante el periodo de estancia de pollos en el nido, los resultados obtenidos durante los 9 años del estudio confirman que el 40% de los pollos (275 de 688) murieron antes de llegar a abandonar el nido. Un 90% del total de pérdidas durante este periodo se debió al fracaso completo de la pollada, mientras que el otro 10% se debió a fracasos parciales. Así pues, los fracasos afectaron al 56% de los nidos y se debieron principalmente a la depredación (89% de los casos), inanición (6%) y causas desconocidas (5%).

La probabilidad de supervivencia diaria de la pollada (*DSR*) fue de 0.939 ± 0.008 , mientras que la probabilidad mínima y máxima de Mayfield de fracaso de la pollada fue del 37.4% y 54.6%, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en la probabilidad de fracaso de la pollada entre poblaciones ($W = 0.30$, $p = 0.58$; Figura III.5). Respecto a las variaciones entre años, se encontraron diferencias significativas en la población de Layna ($W = 20.09$, $p < 0.01$) pero no en la de Valeria ($W = 1.79$, $p < 0.41$; Figura III.5). Los análisis *a posteriori* indican que los años con más fracasos de pollada fueron 1995 y 2007, mientras que 1994 fue el año en el que fracasaron menos polladas (Figura III.5).

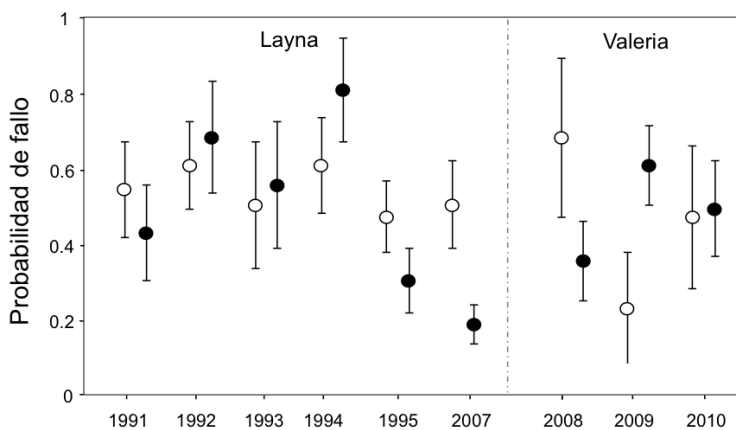


Figura III.5. Probabilidad de fracaso del nido (media \pm se) durante la incubación (círculos blancos) y durante la fase de pollos (círculos negros) en las dos zonas de estudio. Los tamaños muestrales se indican en la Tabla III.1

Los fracasos en la fase de pollos en el nido no estuvieron afectados significativamente por el tamaño de la pollada pero mostraron una relación cuadrática significativa con la fecha de puesta (Tabla III.2).

Las pérdidas parciales durante este periodo ocurrieron en el 17.4% de los nidos que tuvieron éxito ($n= 113$), y se debieron, principalmente, a la muerte de uno de los pollos presentes en la pollada (en el 75% de los casos). La proporción media de pollos no volados fue de 0.06 ± 0.15 , siendo esta media significativamente más alta en Valeria que en Layna (Tabla III.1). No existieron diferencias significativas en los fracasos parciales de pollada entre años en ninguna de las dos poblaciones (Tabla III.1) y tampoco se encontró ningún indicio de que el número de pollos no volados estuviera afectado por la fecha de puesta o el tamaño de pollada (Tabla III.2).

3.3. Efecto del seguimiento de los nidos en los fracasos reproductivos

El valor medio de visitas realizadas a cada nido en este estudio fue de 4.04 ± 2.74 , con una frecuencia de visitas de 0.74 ± 0.71 visitas/día y valor medio de la duración acumulada de todas las visitas a cada nido de 63.28 ± 36.69 minutos. Los resultados del análisis indican que las molestias causadas por el investigador durante el transcurso del seguimiento de la reproducción explicaron el 8.43% de la devianza en la probabilidad de que un nido fracasase, lo que representa el 67.1% de la variación explicada por todo el modelo. Ni el número de visitas ni la frecuencia de las mismas influyó significativamente en la probabilidad de fracaso del nido ($W_{1,61} = 0.01$, $p = 0.92$; $W_{1,61} = 0.60$, $p = 0.44$, respectivamente). La única variable que afectó de forma significativa a la probabilidad de fracaso del nido fue la duración acumulada de las visitas a los nidos ($W_{1,61} = 5.57$, $p = 0.02$), y la pendiente negativa de la relación indica una menor probabilidad de fracaso en nidos con mayor tiempo acumulado de visitas.

4. Parásitos sanguíneos: prevalencia y efecto en adultos y pollos

En este trabajo utilizamos los adultos y pollos de bisbita campestre como un nuevo sistema de estudio de las relaciones parásito-hospedador para explorar cómo se distribuyen los parásitos sanguíneos del grupo de la malaria aviar (géneros *Plasmodium* y *Haemoproteus*) en adultos y pollos, la influencia del sexo del hospedador en la prevalencia en ambos grupos de edad, así como la asociación entre la infección por estos parásitos y la condición en los adultos y el crecimiento en los pollos.

4.1. Metodología

Los datos para este trabajo fueron recogidos en la población de Valeria durante tres temporadas de reproducción (2008 a 2010), sobre una muestra de 105 adultos (63 machos y 42 hembras) capturados. Se tomaron medidas de la longitud del ala y peso de todos los adultos capturados, y se individualizaron con anillas de metal para evitar muestrear dos veces a un mismo individuo. Se tomó una muestra de sangre de cada adulto (5-10 ml) directamente de la vena yugular.

Se tomaron muestras también de 95 pollos (48 machos y 47 hembras) en 28 nidos. A cada pollo se le tomaron muestras en dos visitas, una primera en el periodo entre la eclosión y el tercer día de edad de los pollos, y la otra antes de abandonar el nido, cuando los pollos tenían entre 7 y 11 días de edad. Durante la primera visita, los pollos fueron individualizados para su seguimiento a lo largo del periodo de estancia en el nido (apartado II.2.4. *Marcaje y procesamiento de los pollos*). Se tomó una medida de la longitud del ala y del peso en cada una de las dos visitas, y una muestra de sangre de la vena yugular (2-5 ml) durante la segunda visita al nido.

Las muestras de sangre se conservaron en ethanol hasta su procesamiento en el laboratorio (apartado II.3.1. *Extracción de ADN y sexado molecular*)

4.1.1. Caracterización genética de los parásitos

Para la detección de los parásitos se utilizó el protocolo de reacción en cadena de la polimerasas (PCR) descrito por Waldenström *et al.* (2004), con el que se amplifica un fragmento del ADN mitocondrial (citocromo *b*) de los parásitos de los géneros *Plasmodium* y *Haemoproteus*. En cada PCR, se incluyeron dos muestras positivas de (muestras con infecciones confirmadas) para verificar el correcto funcionamiento de la reacción, y un negativo (ddH₂O) para controlar la presencia de falsos positivos o contaminaciones. De la reacción resultante se evaluó una muestra (2.5µl) en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Las tareas previas a la PCR se realizó en un lugar diferente a las tareas posteriores para evitar contaminaciones. El protocolo completo se realizó por triplicado para confirmar los resultados negativos.

El ADN del fragmento amplificado, en las muestras que resultaron positivas en la reacción de PCR, se limpió utilizando la enzima Exonucleasa I y Fosfatasa alcalina (Fermentas) y se secuenció utilizando el cebador derecho de la PCR y el kit de secuenciación Big Dye Terminator Kit (Applied Biosystems). Las secuencias de ADN se obtuvieron con un secuenciador automático ABI 3130XL (Applied Biosystems). Los datos se procesaron con el programa ABI PRISM1 Sequencing Analysis Software v3.7 (Applied Biosystems). Las nuevas variantes genéticas de parásitos se secuenciaron dos veces para asegurar que la secuencia obtenida era correcta.

4.1.2. Análisis filogenéticos de los parásitos

Todas las secuencias obtenidas fueron editadas manualmente utilizando el programa Bioedit 7.0.5.3 (Hall 1999). Las nuevas variantes genéticas (haplotipos) encontradas se depositaron en la base de datos GenBank (números de acceso: JF279937-JF279958 y KF747759-KF747764). Se estableció la identidad taxonómica de los diferentes parásitos detectados en el bisbita campestre en función de su proximidad filogenética a especies ya conocidas (recopiladas en

bases de datos genéticas) según el concepto morfológico de especie. Para ello, se realizó una búsqueda exhaustiva en la base de datos de la malaria (MalAvi; Bensch *et al.* 2009). Las infecciones múltiples (dos o mas haplótipos diferentes de parásito en una misma muestra de sangre) se detectaron por la presencia de dobles picos en el electroferograma (Pérez-Tris y Bensch 2005).

Las relaciones filogenéticas entre los haplotipos se estimaron mediante inferencia Bayesiana, utilizando el programa MrBayes 3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck 2003). Se utilizó el modelo de evolución molecular GTR+I+G, que fue el modelo que mejor se ajustaba a nuestros datos según el programa jModelTest (Posada 2008). Los análisis se llevaron a cabo mediante el método de cadenas de Markov y Monte Carlo (MCMC) dentro del marco Bayesiano, para estimar la probabilidad *a posteriori* de los árboles filogenéticos. Se utilizaron 2 carreras simultáneas de cuatro cadenas (MCMC) cada una sobre 5 millones de generaciones, muestreadas cada 100 generaciones. El árbol consenso fue construido por la regla de la mayoría del 50% tras descartar el primer 25% de los árboles muestreados como periodo de quemado. La filogenia resultante se visualizó mediante el programa FigTree v1.3.1 (Rambaut 2007).

La divergencia genética entre los diferentes haplotipos de parásitos se calculó utilizando el modelo de distancia de Tajima-Nei implementado en el programa MEGA4 (Tamura *et al.* 2007).

4.1.3. Descripción de las variables y análisis estadísticos

El efecto de la edad y el sexo de los bisbitas en la probabilidad de infección se analizó mediante modelos mixtos generalizados (GLMMs) con una distribución binomial de la variable dependiente (infectado vs. no infectado) y una función de vínculo logística (logit). El modelo se construyó con *año* como factor aleatorio y *sexo*, *edad* y la interacción *sexo x edad* como efectos fijos. La *fecha* se incorporó como un predictor continuo para contemplar su posible efecto sobre la probabilidad de infectarse. La variable *fecha* se calculó como el número de días transcurridos entre el 1 de Abril de cada año y la fecha en que se tomó la muestra. Los individuos que mostraron infecciones múltiples fueron

considerados como infectados en este análisis. Se utilizó la prueba exacta de Fisher (test de dos colas) para evaluar las diferencias en la proporción de individuos de cada sexo y grupo de edad que resultan infectados por cada grupo o clado de parásitos.

El efecto de la infección en la condición corporal de los adultos se determinó mediante modelos mixtos lineares (LMMs), con el peso del adulto como variable dependiente y la longitud del ala como predictor continuo (para corregir por las diferencias de tamaño entre individuos). El *estado de infección* (infectado, no infectado), el *sexo*, y la interacción *estado de infección x sexo* se incluyeron en el modelo como factores fijos. El modelo también incluyó el año como factor aleatorio y la fecha de muestreo como predictor continuo.

En el caso de los pollos, se realizaron modelos LMMs para investigar si las infecciones influyen en su crecimiento (incremento de peso y crecimiento del ala), utilizando las dos medidas de estas variables que se tomaron a cada pollo durante su estancia en el nido.

La tasa de ganancia diaria de peso durante el crecimiento se calculó para cada pollo como: [(peso en la segunda visita–peso en la primera visita)/número de días transcurridos entre la primera y la segunda visita]. La tasa de crecimiento diaria del ala se calculó como: [(longitud del ala en la segunda visita–longitud del ala en la primera visita)/número de días entre la primera y la segunda visita]. Se construyeron dos modelos independientes con el *incremento de peso* o el *incremento del ala* como variables dependientes, el *estado de infección* (infectado o no infectado), el *sexo* y la interacción *estado de infección x sexo* como factores fijos, la *edad* del pollo y la *fecha* de muestreo como predictores continuos, y el *año* y la *identidad del nido* como factores aleatorios.

Todos los análisis se realizaron con el programa R 2.14 (R Core Team 2013). Concretamente, el paquete *lme4* (Bates *et al.* 2013) se utilizó para realizar los modelos LMMs y GLMMs, y el paquete *phia* (de Rosario-Martinez 2013) para realizar los análisis *a posteriori*. Las medias y los parámetros estimados se muestran con sus errores estándar.

4.2. Resultados

En total, 92 de los 200 bisbitas muestreados estuvieron infectados con parásitos de la malaria, lo que representa una prevalencia general del 46% de este tipo de parásitos en nuestras poblaciones (Tabla III.3).

Tras descartar las muestras con infecciones múltiples (3.3%) y las secuencias que no pudieron resolverse con claridad debido a su baja calidad (2.2%), se obtuvieron 86 secuencias de citocromo *b* de *Plasmodium* y una de *Haemoproteus*, que correspondieron con 16 haplotipos únicos de *Plasmodium* y uno de *Haemoproteus*.

El haplotipo de parásito más común en el bisbita campestre fue BIC33 (31%), seguido de BIC39 (16.1%), BIC8 (13.8%), BIC29 (12.6%) y BIC32 (11.5%). El resto de haplotipos se detectaron en una baja prevalencia (menos del 3.0% de todas las infecciones). Se llevó a cabo una búsqueda de homologías en BLAST (la herramienta básica de búsqueda de secuencias similares en bases de datos genéticas ya publicadas) para todos los haplotipos del citocromo *b* encontrados en el bisbita campestre, y se detectó que 6 de los haplotipos de *Plasmodium* ya se habían registrado previamente infectando a otras especies de aves: BIC29 (KF747759), BIC32 (KF747760), BIC33 (KF747761), BIC36 (KF747762), BIC37 (KF747763) y BIC39 (KF747764). Los 11

Año	Adultos				Pollos			
	Macho		Hembra		Macho		Hembra	
	No inf.	Infectado	No inf.	Infectado	No inf.	Infectado	No inf.	Infectado
2008	24	8 (0.25)	16	2 (0.11)	15	5 (0.25)	14	2 (0.12)
2009	7	12 (0.63)	8	7 (0.46)	5	8 (0.61)	12	7 (0.37)
2010	0	12 (1.0)	2	7 (0.77)	1	14 (0.93)	4	8 (0.66)
Total	31	32 (0.51)	26	16 (0.38)	21	27 (0.56)	30	17 (0.36)

Tabla III.3. Distribución por edades y sexos del número de individuos infectados y no infectados (No inf.) y prevalencia (entre paréntesis) de los parásitos de la malaria aviar en el bisbita campestre. Datos de los tres años de estudio en la población de Valeria.

haplotipos restantes no han sido descritos previamente, y presentaron una divergencia genética de entre 0.23% y 1.87% con respecto a los haplotipos de *Plasmodium* o de *Haemoproteus* más cercanos registrados en el GenBank hasta la fecha.

4.2.1. Agrupación de haplotipos e identificación de especies de parásitos

El árbol filogenético resultante de los análisis bayesianos se muestra en la Figura III.6. Dentro de cada género (*Plasmodium* y *Haemoproteus*) se ha utilizado la nomenclatura según el concepto morfológico de especie, basándonos en la pertenencia y el soporte estadístico de las ramas respecto a las variantes genéticas publicadas previamente.

Para los parásitos del género *Plasmodium* se han encontrado cinco grupos (clados) diferentes (Clados A - E; Figura III.6) con distancias genéticas entre haplotipos dentro de cada clado en un rango de 0.2% a 0.7% (media= 0.44%, desviación estándar= 0.2%), mientras que la divergencia genética entre clados varía entre 3.4% y 8.5% (media= 6.4%, $de= 2.1\%$). De los cinco clados existentes en la muestra, sólo dos pueden asociarse con especies de parásitos conocidas (Clado C: *Plasmodium cathemerium* y Clado B: *Plasmodium relictum*). En el caso de los parásitos del género *Haemoproteus* se ha encontrado un clado (Clado F) que incluye el único haplotipo aislado en el bisbita campestre (BIC15) y no contiene secuencias de ninguna de las especies de *Haemoproteus* descritas previamente.

4.2.2. Variación en la prevalencia de parásitos

La prevalencia en las infecciones por parásitos de la malaria aviar en la población de bisbita campestre estudiada no mostró variación significativa con la fecha de muestreo (Tabla III.4). Tampoco hubo diferencias significativas en la proporción de infectados según el grupo de edad, que fue de 0.45 y 0.46 en adultos y pollos, respectivamente (Tabla III.3). Sin embargo, las hembras de bisbita campestre tuvieron una prevalencia mayor que los machos en los tres años de estudio (Tablas III.3 y III.4). La proporción de hembras

III. REPRODUCCIÓN, DEPREDACIÓN Y PARÁSITOS

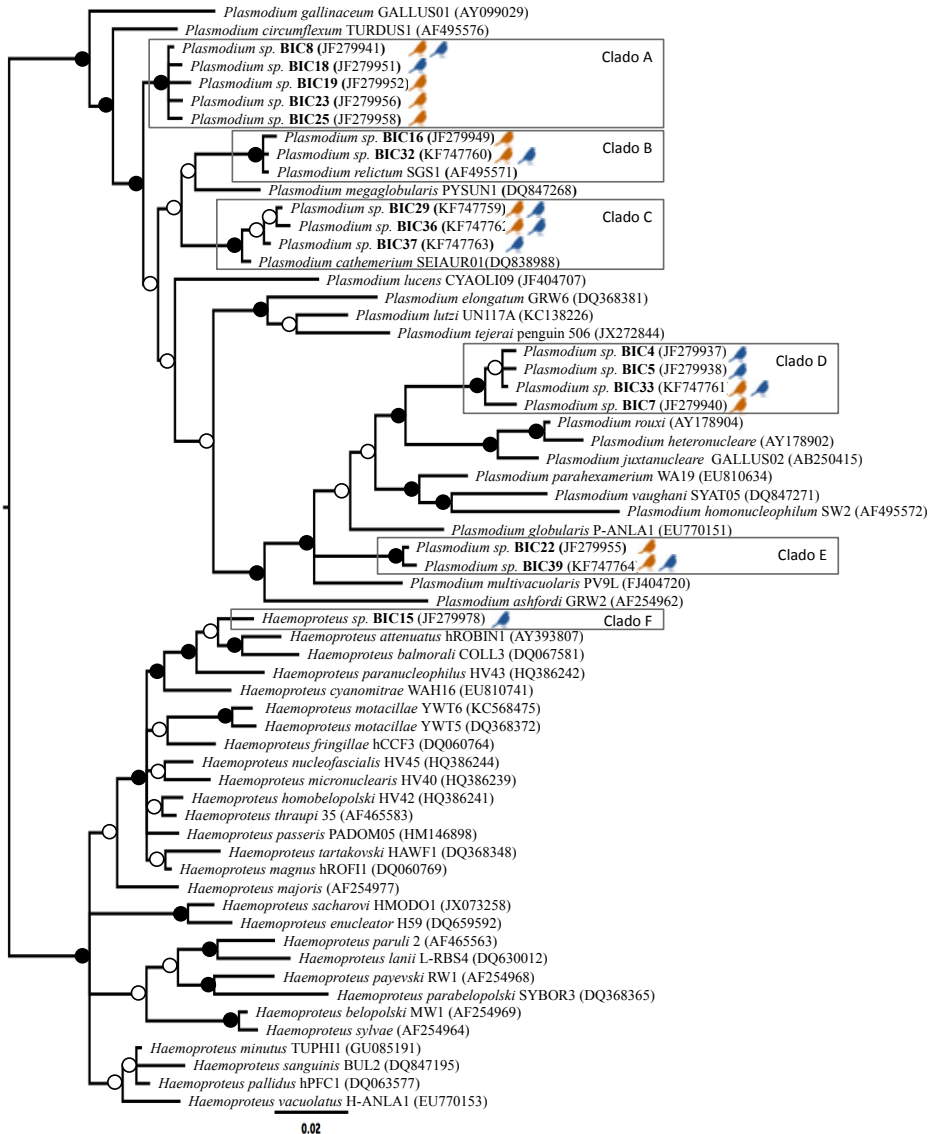


Figura III.6. Relaciones filogenéticas entre las secuencias de parásitos obtenidas en este estudio (en negrita) y las de especies conocidas de los géneros *Plasmodium* y *Haemoproteus*. Para todas las secuencias se muestra su número de referencia en GenBank. Los círculos negros y blancos indican, respectivamente, los nodos con probabilidad posterior >90%, y entre el 50% y el 90%. Los haplotipos están dispuestos en clados que agruparían especies de parásitos diferentes. Para cada haplotipo encontrado en nuestras poblaciones se muestra su presencia en adultos (icono ave azul) y en pollos (icono ave naranja).

III. REPRODUCCIÓN, DEPREDAIÓN Y PARÁSITOS

y machos infectados fue de 0.37 y 0.53, respectivamente, y el patrón es consistente entre grupos de edad, como demuestra la ausencia de interacción significativa entre el sexo y la edad (Tabla III.4).

Cuando observamos la distribución de los clados por grupos de edad podemos comprobar que los pertenecientes al género *Plasmodium* (clados A al E) aparecen tanto en adultos como en pollos (Figura III.6), mientras que el clado F (*Haemoproteus*) únicamente se detectó en adultos. La prevalencia del clado A en el bisbita campestre fue de 8.0% (n= 200) y aparece en proporción similar en ambos grupos de edad (adultos: 4.76%; pollos: 11.58%; prueba exacta de Fisher, dos colas, $p= 0.11$). La prevalencia del clado B fue del 5.5% (adultos: 7.62%; pollos: 3.16%, Fisher $p= 0.22$). La prevalencia del clado C fue del 7.0% (adultos: 10.48%, pollos: 3.16%, Fisher $p= 0.053$), mientras que la prevalencia del clado D fue del 15% y similar entre las dos clases de edad (16.19% en adultos y 13.68% en pollos, Fisher $p= 0.69$). Finalmente, la prevalencia del clado E fue del 7.5% (adultos: 4.76 %, pollos: 10.53%, Fisher $p= 0.18$).

Respecto a las diferencias entre sexos, encontramos diferencias significativas en la prevalencia de los clados B y C, con valores mas altos en machos que en hembras (clado B: machos 12.0%; hembras 1.12%, Fisher $p= 0.02$; clado C: machos 9.0%, hembras 1.12%, $p= 0.02$). El resto de clados aparecieron en proporciones similares en ambos sexos ($p> 0.05$ en todos los casos).

Variable	Estimador	Estadístico (Z)	<i>p</i>
<i>Fecha de muestreo</i>	0.023	1.380	0.166
<i>Edad</i>	-0.403	-0.778	0.435
<i>Sexo</i>	2.033	2.130	0.033
<i>Edad x Sexo</i>	-0.854	-0.793	0.427

Tabla III.4. Resultados de los modelos mixtos generalizados para evaluar el efecto del sexo y la edad del hospedador en la probabilidad de infección. Los adultos y las hembras son los grupos de referencia para interpretar el sentido de la relación. Los resultados significativos se indican en negrita.

4.2.3. Efecto sobre la condición física en adultos

En general, el peso del individuo se relaciona de forma positiva y significativa con la longitud del ala ($t= 2.70, p= 0.008$) y fue mayor en machos que en hembras ($t= 1.94, p= 0.055$; Figura III.7). Los adultos infectados tuvieron una peor condición física (peso corregido por tamaño) que los no infectados ($t= -2.91, p= 0.004$), y la interacción significativa entre estado de infección y el sexo (infección x sexo: $t= 2.00, p= 0.048$) indica que la infección es perjudicial para las hembras (post-hoc: $\chi^2_1 = 8.49, p= 0.007$) mientras que no hubo efecto aparente para los machos ($\chi^2_1 = 0.23, p= 0.63$) (Figura III.7). No hubo evidencia estadística de que la fecha de muestreo influyera sobre la condición ($t= -0.78, p= 0.44$).

4.2.4. Efecto sobre el crecimiento de los pollos

El sexo de los pollos explicó la mayor parte de la variación en la tasa diaria de ganancia de peso (incremento de peso $=1.90 \pm 0.05$ g. para los machos y 1.72 ± 0.05 para las hembras, $t= 5.48, p < 0.0001$). En

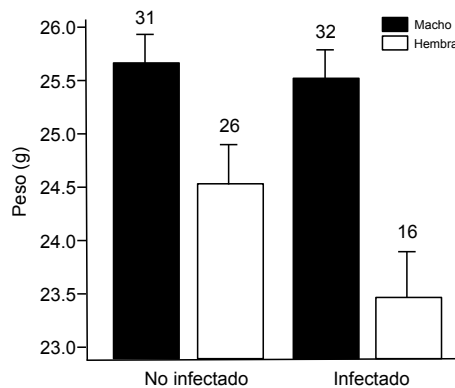


Figura III.7. Efecto de las infecciones por malaria aviar sobre la condición de los adultos (se muestra el peso del individuo una vez controlado por la longitud del ala en el modelo). La figura muestra la interacción entre sexo y estado de infección según los datos obtenidos del modelo lineal mixto (véase metodología). El tamaño muestral se indica sobre las barras de error.

general, los pollos infectados ganaron peso a la misma tasa que los no infectados ($t = -0.035$, $p = 0.97$). Sin embargo, la interacción entre el sexo y el estado de infección fue estadísticamente significativa ($t = -2.29$, $p = 0.025$) poniendo de manifiesto que los machos infectados tuvieron una ganancia de peso menor que los machos no infectados (post hoc: $\chi^2_1 = 7.23$, $p = 0.014$), mientras que las hembras infectadas y no infectadas ganaron peso al mismo ritmo ($\chi^2_1 = 0.00$, $p = 0.97$, Figura III.8). A la hora de analizar la ganancia de peso durante el crecimiento, ni la edad del pollo ($t = -1.38$, $gl = 51.58$, $p = 0.17$) ni la fecha de muestreo ($t = -0.11$, $gl = 21.34$, $p = 0.91$) resultaron significativas en el modelo.

Respecto al crecimiento del ala, la tasa diaria fue mayor en los pollos macho que en las hembras (machos: 5.18 ± 0.08 mm, hembras: 4.87 ± 0.09 mm, $t = 3.52$, $p = 0.0008$). Las diferencias entre infectados y no infectados en el incremento de la longitud del ala no fueron significativas ($t = 1.03$, $p = 0.31$), y la interacción entre el sexo y el estado de infección tampoco ($t = 0.07$, $p = 0.97$), mientras que la edad del pollo fue marginalmente significativa en el modelo ($t = -1.98$, $p = 0.053$).

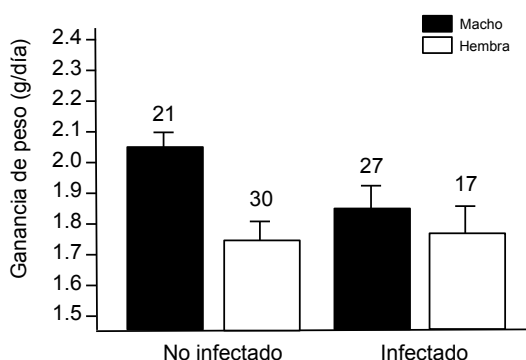


Figura III.8. Efecto de las infecciones por malaria aviar sobre el crecimiento de los pollos. Se muestra la variación en la tasa diaria de ganancia de peso (gramos/día) en relación al sexo y al estado de infección. Los datos que se muestran son el resultado del modelo (medias ajustadas + se), y el tamaño muestral se indica sobre las barras de error.

5. Discusión

5.1. Parámetros reproductivos

Esta tesis constituye el estudio más exhaustivo realizado hasta la fecha sobre la reproducción de el bisbita campestre en la región mediterránea, donde se concentra la mayor parte de la población europea de la especie (BirdLife International 2010). En general, nuestros resultados sugieren que la reproducción del bisbita campestre en los páramos ibéricos están controlada principalmente por dos factores relacionados entre sí: la estacionalidad de recursos y la depredación del nido.

Las condiciones ambientales que experimentan las aves mediterráneas se sitúan entre las condiciones templadas del norte y las condiciones tropicales, con primaveras más cálidas y una estacionalidad menos marcada que en lugares mas norteños. Según las hipótesis tradicionales de la variación latitudinal de las estrategias vitales (Lack 1950; Ashmole 1961; Slagsvold 1982) esta situación intermedia permite la existencia de periodos reproductivos más largos en las regiones mediterráneas (los individuos llegan mas temprano a las áreas reproductivas y tienen rutas migratorias más cortas) y, en consecuencia, un aumento del número de eventos reproductivos por temporada.

Sin embargo, parecen existir una serie de restricciones en la reproducción debidas probablemente a condiciones ambientales como el fotoperiodo, la temperatura o la disponibilidad de alimento, todas variables con importantes efectos sobre la reproducción (véase una revisión en Dunn 2004). Esto implica que las tendencias estacionales y latitudinales observadas en los patrones reproductivos de estas especies podrían presentar variaciones notables con respecto a lo esperado (ejemplos en Moreno 2004). De acuerdo con nuestros datos este parece ser el caso de las poblaciones españolas de bisbita campestre, ya que no muestran un inicio más temprano de la reproducción ni un periodo reproductivo más largo que las poblaciones

III. REPRODUCCIÓN, DEPREDACIÓN Y PARÁSITOS

de bisbitas situadas más al norte (Figura III.1). Además, y según la teoría, el tamaño de puesta debería ser mayor en áreas situadas más al norte y más estacionales que en las poblaciones mediterráneas (véase por ejemplo Lack 1947; Sanz 1997). Curiosamente este patrón no es patente a la vista de nuestros resultados, pues el tamaño de puesta en las poblaciones de bisbita estudiadas es similar y está dentro del rango previamente registrado en poblaciones del norte de Europa (Tabla III.5). Las características concretas de las estepas arbustivas mediterráneas podrían jugar un papel importante a la hora de explicar porqué el patrón latitudinal esperado no se cumple aquí.

Los resultados de este trabajo coinciden con los estudios que describen la variación estacional en el tamaño de puesta en especies que pueden realizar varias puestas (Crick *et al.* 1993). Las especies que nidifican una única vez por temporada suelen iniciar el periodo de puesta cuando el tamaño de puesta óptimo es el máximo, mientras que las especies que realizan varias puestas en la misma temporada adelantan el inicio de la puesta antes del óptimo a fin de tener suficiente tiempo para realizar varias puestas en la misma temporada (Crick *et al.* 1992). Según esto, la producción de pollos en las primeras normalmente disminuye a medida que avanza la temporada mientras que las segundas suelen tener un máximo de productividad hacia la mitad de la estación de reproducción (Crick *et al.* 1993; Perrins 1970;

Población	Autores	Año	N	TP	NºP	FI (%)	FP (%)
Sur Suecia (Su)	(Högestedt 1978)	1968-1973	56	4.23	2	11-20	26-40
Este Alemania (Al)	(Krüger 1989)	1980	21	3.85	2	Sin datos	55
Holanda (Ho)	(Bijlsma 1978)	1975-77	17	4.47	2	9-20	23-40
España Central: Layna	Esta tesis	1991-95, 2007	163	4.18	2	37-50	10-67
España Central: Valeria	Esta tesis	2008-10	72	4.22	1	14-57	26-50

Tabla III.5. Comparación de los parámetros reproductivos obtenidos en este estudio con los obtenidos en estudios previos sobre la especie. La localización geográfica de cada trabajo se muestra en la figura III.1. Abreviaturas: TP: tamaño de puesta; NºP: número de pollos; FI: fracasos en incubación; FP: fracasos de pollada.

Svensson 1995). En nuestro caso, la pendiente inicial de la relación cuadrática entre la fecha de puesta y el tamaño de puesta es positiva (mientras que debería ser cero o negativa en las especies con una única puesta por temporada), aunque el tamaño de puesta alcanza su máximo valor rápido en la temporada (Figura III.3). Si se tiene en cuenta el tiempo necesario para completar un evento reproductivo (alrededor de 32 días; Cramp 1998; presente estudio) y la duración de la temporada reproductora en las dos poblaciones de estudio (Figura III.1), teóricamente existe tiempo suficiente de realizar más de un intento reproductivo con éxito por temporada. Sin embargo, las segundas puestas en las poblaciones mediterráneas de esta especie son anecdóticas (apartado III.2. *Dobles puestas y puestas de reposición*) (Figura III.4) probablemente debido a limitaciones temporales en la abundancia de alimento hacia el final de la temporada (Martin 1987) y a las altas tasas de depredación. En este sentido, mientras que las puestas mas grandes al principio de la temporada sugieren que el alimento no está limitado en ese momento, el pequeño tamaño de las puestas tardías podrían indicar una falta de recursos que estaría marcando el final de la temporada de reproducción. La disminución en la calidad (peso y tamaño) de los nidos y en la condición física de las hembras a medida que avanza la temporada de reproducción descrita en trabajos previos (Suárez *et al.* 2005a, b) confirmaría la existencia de restricciones severas hacia el final de la temporada. Este hecho, junto con la alta tasa de pérdidas por depredación de nidos que obliga a las hembras a realizar puestas de reposición (Suárez. 2005a), podría impedir la existencia de segundas puestas en las poblaciones mediterráneas de esta especie, tal y como se ha indicado en el apartado III.2. (*Dobles puestas y puestas de reposición*).

La variación individual en la producción de pollos en esta especie está íntimamente relacionada con las tasas de depredación. La depredación de nidos influye en el número de pollos que vuelan en otros passeriformes que nidifican en el suelo en paisajes abiertos (Suárez y Manrique 1992; Martin 1993; Yanes y Suárez 1995), y está considerada como una potente factor de selección en la evolución de la selección del lugar de nidificación y de las estrategias reproductivas

en aves (Magnhagen 1991; Skutch 1949; Lack 1968; Ricklefs 1969). Hasta donde sabemos, las tasas de depredación del nido registradas en nuestras áreas de estudio son las mayores descritas para la especie, siendo responsables del 85% de los fracasos durante la incubación y del 89% durante la crianza de los pollos (apartado III.3. *Fracasos durante la reproducción y depredación de nidos*). Las tasas de depredación son más altas en el centro de España que en las poblaciones del norte, especialmente durante la incubación, probablemente debido a una comunidad de depredadores más amplia en latitudes más bajas (Suárez y Manrique 1992; Yanes y Suárez 1995, 1996). Somos conscientes de que los resultados pueden estar sesgados por la alteración provocada por el investigador al visitar repetidamente los nidos) (Götmark 1992). Sin embargo, nuestros análisis muestran que ni el número, ni la frecuencia de visitas, ni el tiempo de manejo, reducen significativamente el éxito del nido (apartado III.3.3. *Efecto del seguimiento de los nidos en los fracasos reproductivos*), coincidiendo con lo observado en estudios previos realizados con especies cercanamente emparentadas (Weidinger 2008; Jacobson *et al.* 2011; Lloyd *et al.* 2000; pero véase también Major 1990; Tryjanowski y Kuzniak 1999). Asimismo es importante señalar que los fracasos que ocurren una vez que los pollos han abandonado el nido no están contemplados en este estudio, y que según Bijlsma (1978), aproximadamente un 64% de los volantones no sobreviven hasta la etapa adulta. Podemos inferir, por tanto, que el total de reclutamientos por temporada debe ser realmente bajo en nuestras poblaciones de estudio.

Estudios de otros autores también han revelado altas tasas de fracaso por depredación en aves que instalan sus nidos en el suelo (Wright *et al.* 2009; Martin 1993; Suárez *et al.* 1993), y la mayoría de ellos muestran un patrón constante de incremento en la probabilidad de depredación a lo largo de la temporada (Skutch 1949; Slagsvold 1982; Grant *et al.* 2005; Evans *et al.* 2005). En nuestro caso no es así. Los fracasos en la incubación son más o menos constantes durante la temporada, pero los fracasos que ocurren durante la fase de estancia de los pollos en el nido muestran una relación negativa con la fecha de puesta, lo que indica un descenso estacional en la tasa de depredación.

La depredación durante la incubación puede estar relacionada con ciertas especies de depredadores como lagartos, serpientes o roedores, que pueden mantener una presión de depredación constante a lo largo del tiempo (Weatherhead *et al.* 2003). Estos son los depredadores típicos de huevos de aves en las áreas mediterráneas (Yanes y Suárez 1996) donde alcanzan mayores abundancias que en latitudes más al norte (Blondel *et al.* 2010).

La falta de ajuste entre el número de pollos eclosionados y el número de volantones origina que los eventos reproductivos situados hacia mitad de la temporada sean mas productivos que los eventos tempranos o tardíos (Figura III.3). La teoría de las estrategias vitales y determinados estudios empíricos permiten predecir que la reproducción temprana confiere a los individuos un mayor éxito reproductivo (Perrins 1970), pues permite más intentos de reproducción por temporada o la posibilidad de realizar una nueva puesta tras ser depredada la primera. Además, la tasa de supervivencia de nidos debería disminuir significativamente a medida que avanza la temporada. El porcentaje de nidos depredados en nuestras poblaciones se estabiliza justo antes de la mitad de la temporada (Figura III.9), coincidiendo con el momento en que la productividad del bisbita es máxima. La disminución estacional observada en la probabilidad de fracaso del nido probablemente se relaciona con un aumento de pollos 'disponibles' para los depredadores a medida que avanza la reproducción (Figura III.9), de manera que al principio de la temporada hay pocos pollos disponibles para los depredadores (alta presión de depredación por cada nido) y la mayor parte son depredados. Sin embargo, a medida que las puestas van eclosionando existe cada vez mayor cantidad de pollos disponibles para los depredadores en la población, lo que hace que la presión de depredación por cada nido se vaya reduciendo. Hay que considerar que esto puede suceder no sólo en el bisbita campestre sino también en otras especies de passeriformes que se reproducen en la misma zona, como la alondra común *Alauda arvensis* o la terrera común *Calandrella brachydactyla*, todas especies-presa similares al bisbita y que tienen la misma fenología (Suárez *et al.* 2005c).

III. REPRODUCCIÓN, DEPREDACIÓN Y PARÁSITOS

No podemos determinar hasta que punto la depredación de nidos es suficiente o no para restringir, a una escala mas global, la reproducción de las aves que anidan en el suelo en zonas abiertas en el Mediterráneo. Sabemos que la depredación reduce el beneficio esperado de la reproducción temprana en el bisbita campestre, al igual que sucede en otras especies de passeriformes (Mallord *et al.* 2008), por lo que existen argumentos evidentes para suponer que la depredación de nidos es un potente agente de selección para la reproducción de el bisbita campestre en hábitats mediterráneos.

A la vista de los resultados aportados en esta sección podemos concluir que la biología reproductiva del bisbita campestre en latitudes mediterráneas parece mediada en gran parte por la depredación de nidos, que impone un severo límite a la productividad de la población. Esto, junto con la escasa posibilidad de realizar dobles puestas en latitudes meridionales genera un escepticismo considerable sobre la viabilidad a largo plazo de las poblaciones mediterráneas de la especie. La comparación de los parámetros reproductivos del bisbita en nuestras poblaciones y en poblaciones del centro y norte de Europa pone de manifiesto las particularidades de las poblaciones mediterráneas y la necesidad de realizar estudios en ellas para tener una visión global de las estrategias vitales en la especie.

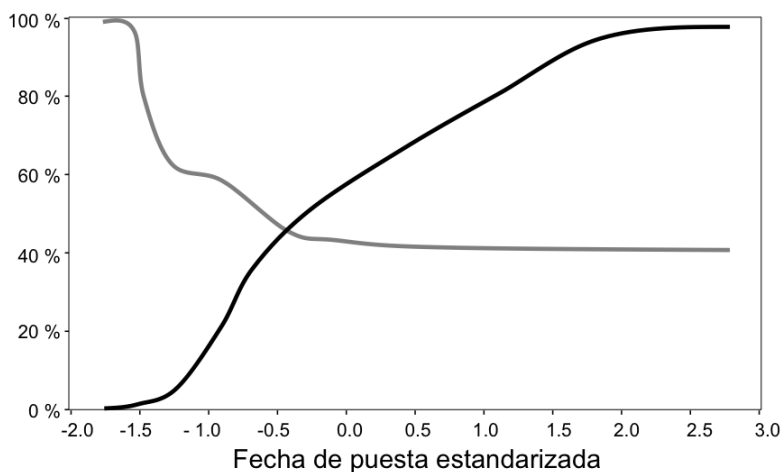


Figura III.6. Representación gráfica del porcentaje acumulado de pollos de bisbita campestre vivos (línea negra) y de la proporción de pollos depredados (línea gris) a lo largo del periodo reproductivo en el centro de España.

Desde el punto de vista de la conservación, la investigación futura sobre ésta y otras especies próximas deberían focalizarse en estudiar la conectividad entre poblaciones (dinámicas de población fuente-sumidero) y las respuestas específicas contra la depredación, con el fin de conocer realmente la viabilidad futura de las especies que se reproducen en espacios abiertos.

5.2. Efecto de los parásitos de la malaria sobre la reproducción

Al igual que en el caso de los depredadores, los parásitos también ejercen una importante influencia en la reproducción del bisbita campestre en nuestras poblaciones. En primer lugar, los parásitos de la malaria aviar son prevalentes ya en pollos de 7-11 días, lo que confirma los patrones detectados en otros passeriformes (Zehtindjiev *et al.* 2012). Aún más importante es el hecho de que hayamos detectado prevalencias en pollos similares a las encontradas en adultos y que afectan casi a la mitad de los individuos de cada grupo de edad en la población. Por último, los pollos infectados ganan peso mas despacio que los pollos no infectados y las hembras adultas se ven afectadas en su condición física.

El efecto de la edad del huésped en la prevalencia de los parásitos es un tema controvertido en ecología de aves. De un lado, la acumulación de encuentros entre el huésped y el parásito a lo largo del tiempo (acumulación de infecciones con la edad), es un argumento a favor de un patrón esperado con mayor prevalencia en adultos que en jóvenes (Hudson y Dobson 1995, Deviche *et al.* 2005), puesto que los segundos no han tenido tanto tiempo para experimentar contactos con los parásitos como los primeros. De otro lado, las defensas inmunológicas y conductuales contra los parásitos son menores en los pollos que en los adultos, lo que sugieren el patrón opuesto, con una prevalencia esperada más alta en los pollos que en los adultos (Hudson y Dobson 1997, van Oers *et al.* 2010). Hasta la fecha son escasos los estudios que han comparado explícitamente las infecciones por malaria aviar entre pollos y adultos en condiciones naturales, ya que el periodo prepatente (tiempo transcurrido entre la entrada del parásito y el momento en que es detectable en sangre) es con frecuencia más largo que el periodo de

estancia de los pollos en el nido de la mayor parte de especies de aves (véase Cosgrove *et al.* 2006), lo que dificulta su detección en los pollos.

Los resultados obtenidos con el bisbita campestre son coherentes con la hipótesis de que el sistema inmune poco desarrollado y sin contacto previo con el parásito hace que los pollos sean altamente susceptibles a desarrollar infecciones. El patrón de infección en relación a la edad encontrado en este estudio indica una rápida acumulación de parásitos en cuanto los individuos son susceptibles de ser infectados. Teniendo en cuenta la edad de los pollos en este trabajo (7-11 días) y que el periodo prepatente de las especies de *Plasmodium* y *Haemoproteus* en aves varían entre 2 días y varios meses (Valkiunas, 2005), es probable que una importante fracción de los pollos que hemos considerado como ‘no infectados’ pudieran estar realmente infectados en el momento del muestreo. De ser así, estaríamos infravalorando la prevalencia real en pollos, y la curva de prevalencia-edad podría ajustarse mejor a una disminución de la malaria con la edad (van Oers *et al.* 2010) típica de un patrón de selección de la viabilidad mediada por parásitos (Sol *et al.* 2003, Wood *et al.* 2013).

Una disminución de la prevalencia con la edad podría simplemente estar indicando la pérdida (muerte) de individuos infectados en la población (Sol *et al.* 2003, van Oers *et al.* 2010) o bien la eliminación de los parásitos o su entrada en estado latente (permaneciendo en los tejidos del hospedador y no en la sangre) a lo largo de la vida de los individuos (Jarvi *et al.*, 2002, 2003). Con los datos de este estudio no podemos ir mas lejos y diferenciar entre estas posibilidades, pero el tema merece una investigación mas a fondo ya que puede revelar patrones que permitan la cuantificación de las tasas de transmisión de los parásitos entre hospedadores, la mortalidad del huésped inducida por el parásito y el desarrollo de la capacidad de resistencia por parte del hospedador.

Aunque sólo podemos especular acerca del proceso a través del cual se producen las infecciones, nuestra interpretación es que las diferencias específicas entre los grupos de edad en cuanto a los compromisos fisiológicos explicarían, al menos en parte, el patrón observado (van Oers *et al.*, 2010). Sabemos que los pollos de bisbita eclosionan en el momento en que la prevalencia de los parásitos

muestran su máximo en las poblaciones de vectores (Beaudoin *et al.* 1971, Cosgrove *et al.* 2008) por lo que cabe esperar que los pollos adquieran de forma rápida los numerosos parásitos presentes en el área de reproducción. La maduración del sistema inmune en las aves se puede prorrogar durante varias semanas después de la eclosión, por lo que la inversión en inmunidad puede suceder a costa de la inversión en crecimiento somático (revisión en Møller *et al.*, 2009) lo que puede ser especialmente importante en especies que tienen *crecimiento determinado* como muchos paseriformes –en las que el crecimiento cesa antes que los pollos abandonen el nido.

Más aún, en especies o poblaciones sometidas a altas tasas de depredación de nidos, el compromiso entre la inversión en defensa inmunitaria y la inversión en crecimiento puede ser particularmente importante, puesto que la depredación es un factor ecológico que ejerce una fuerte selección sobre la tasa de crecimiento en paseriformes (Remës y Martin 2002; Martin *et al.* 2011). Como consecuencia, los pollos de especies altriciales o semi-altriciales como los de bisbita campestre deben alcanzar el tamaño adulto más rápido que las especies precociales (p.e. Cheng y Martin 2012), indicando que el crecimiento está comprimido en un periodo de tiempo mas corto debido a una fuerte presión evolutiva para abandonar el nido tan pronto como sea posible, a fin de evitar o minimizar la depredación (Bosque y Bosque 1995). Por tanto, los pollos de bisbita podrían estar priorizando su crecimiento frente al desarrollo de la función inmune, causando una incidencia elevada de los parásitos en este grupo de edad a pesar de un corto periodo de exposición a los parásitos.

La alta prevalencia encontrada en los pollos, junto con el hecho de que la mayor parte de los haplotipos infectan tanto a los pollos como a los adultos, apunta a una transmisión de estos parásitos en las zonas de reproducción europeas del bisbita campestre. La única excepción es el haplotipo de *Haemoproteus*, que se detectó sólo en adultos. Esto sugiere que los parásitos de este clado podrían haber sido transmitidos en las zonas Africanas de invernada tal y como ha sido propuesto para muchos otros haplotipos de *Haemoproteus* y *Plasmodium* para los cuales no existen apenas vectores apropiados en Europa (Hellgren *et al.*, 2007). Otra posibilidad es que el periodo

prepatente de *Haemoproteus* descrito hasta la fecha (entre 11 días y 3 semanas) sea insuficiente para poder detectar su presencia en nuestro rango de edad de los pollos.

Respecto a las diferencias sexuales, los estudios que demuestran una prevalencia y/o intensidad de infección desigual entre machos y hembras, y en particular sesgadas hacia los machos, son muy numerosos (Folstad y Karter 1992; Poulin 1996; Schalk y Forbes 1997; Zuk y Stoehr 2009, Skorpiny y Jensen 2004, Nunny Altizer 2006). No obstante, el sesgo sexual en el parasitismo no es universal ni consistente, y en ocasiones varía entre diferentes sistemas parásito-hospedador e incluso dentro del mismo sistema de estudio (Korpimäki *et al.* 1993, Wood *et al.* 2007, van Oers *et al.* 2010). En el caso del bisbita campestre son los machos los que muestran una prevalencia mas alta en ambos grupos de edad, un patrón coherente con las diferencias sexuales en la susceptibilidad debido a diferencias fisiológicas entre los sexos (McCurdy *et al.* 1998). En el sistema de la malaria aviar, el sexo del hospedador es considerado una importante fuente potencial de variación tanto en prevalencia como en los costes de los parásitos para el hospedador (McCurdy *et al.* 1998). Las explicaciones de este sesgo ligado al sexo pueden ser causadas por diferentes factores que giran en torno a dos hipótesis no excluyentes: 1) ciertas hormonas del hospedador tienen un efecto inmunosupresivo sobre las defensas contra los patógenos, y 2) debido a las diferencias morfológicas y/o de comportamiento, un sexo tienen mayor probabilidad de ser parasitado por exposición diferencial a los vectores (Zuk 1990, Folstad y Karter 1992). En el bisbita campestre, los machos y las hembras no se diferencian sustancialmente en peso o en coloración (Alström y Mild 2003) y la distribución de unos y otros se solapa dentro de los territorios, que no son además lo suficientemente grandes para explicar diferencias en la exposición a los vectores entre machos y hembras (tamaño de los territorios entre 3.5 y 12.1 ha; Bijlsma 1990). Aunque las diferencias comportamentales entre machos y hembras no se pueden excluir como una explicación potencial, las evidencias son claras a favor de que las hormonas asociadas al sexo pueden influir directamente en la susceptibilidad a las infecciones (p.e. Folstad y Karter 1992). La testosterona, por

ejemplo, tiene efecto inmunosupresor en muchas especies, lo que implica un incremento de la susceptibilidad de los machos frente a la infección por parásitos (Hillgarth *et al.* 1997). No obstante, mientras que el efecto inmunosupresor de las hormonas sexuales es un fenómeno bien conocido y que podría explicar los resultados en adultos (p.e. Owen-Ashley *et al.* 2004, Mougeot *et al.* 2006), en el caso de los pollos la relación no está tan evidente, puesto que las diferencias en la susceptibilidad a los parásitos pueden no deberse a diferencias sexuales en cuanto a los niveles de testosterona en circulación (véase por ejemplo Fargallo *et al.* 2007). No podemos concluir con rotundidad acerca del motivo por el cual los pollos machos se infectaron más que las hembras, pero los resultados encontrados sobre el crecimiento diferencial entre sexos, que se discute a continuación, podrían arrojar luz sobre este tema.

Los pollos de ambos sexos abandonan el nido al mismo tiempo (datos de este estudio). Por lo tanto, en una especie donde los machos son ligeramente mayores en longitud de ala que las hembras (Alström y Mild 2003) los machos necesitarían crecer más rápido que sus hermanas, tal y como demuestra la mayor tasa de crecimiento del ala encontrada en los pollos macho respecto a la de los pollos hembra.

La estrategia de crecimiento de passeriformes de este tipo, con altas tasas de depredación del nido, puede estar dirigida en buen parte por la necesidad de abandonar el nido tan pronto como sea posible, lo que depende de su habilidad para poder volar y, por tanto, del crecimiento o desarrollo de las alas. De esta manera, los pollos macho se verán obligados a invertir más recursos en crecimiento propio y menos en prevenir infecciones que las hembras, lo que puede traducirse en una prevalencia mayor en machos que en hembras. En un estudio comparativo con anfibios, Johnson y colaboradores (2012) encontraron que las especies de anfibios con crecimiento rápido fueron más susceptibles a infecciones y patógenos que las especies con crecimiento más lento. Dentro del grupo de las aves, la selección en favor del crecimiento se sabe que compromete la función inmune en aves comerciales (puede encontrarse un meta-análisis en van der Most *et al.* 2011). En nuestro estudio, aunque el incremento de la longitud

del ala es mayor en pollos macho que en pollos hembra, la estrategia de crecimiento del ala en ambos sexos parece no estar afectada por las infecciones de parásitos. Puesto que un desarrollo más rápido del ala podría facilitar tanto el escape de los depredadores como la supervivencia fuera del nido, el crecimiento de los componentes del cuerpo que pueden reducir el riesgo de depredación podría estar priorizado frente al peso en especies con un mayor riesgo de depredación de los pollos (Cheng y Martin 2012). Por el contrario, hay una estrategia de crecimiento claramente diferente en machos y hembras en relación a la tasa a la cual los individuos aumentan su masa corporal cuando están infectados de malaria. La ventaja de “ser macho” –alcanzar mayor peso y un tamaño que las hembras–, y las ventajas competitivas asociadas (p.e. Oddie 2000) parecen convertirse en un hándicap cuando los individuos están infectados, es decir, cuando la presión selectiva para un crecimiento rápido es mayor. En el bisbita campestre observamos que el impacto de los parásitos en términos de aumento de tamaño es particularmente importante en el sexo que crece más rápido (Szép y Moller 1999), lo que apoya esta idea. Desafortunadamente no disponemos de datos para evaluar el modo en que una reducida condición física durante el crecimiento puede afectar a las tasas de mortalidad posteriores, pero varios autores han demostrado relaciones de este tipo (Gebhardt-Henrich y Richner 1998, Fitze *et al.* 2004). Por lo tanto, en especies/poblaciones que evolucionan bajo una fuerte presión de depredación de nidos, como el bisbita campestre, el impacto de los parásitos de la malaria aviar podría influir en última instancia en las tasas de mortalidad de los pollos.

Una vez que se alcanza la edad adulta las presiones selectivas cambian, y los compromisos entre el sistema inmune y la inversión en reproducción hacen a las hembras más vulnerables frente a los efectos de los parásitos que los machos. En el bisbita las hembras invierten más en tiempo y energía durante la reproducción que los machos debido a que son las únicas encargadas de incubar los huevos y alimentar a los pollos. Como consecuencia, las hembras muestran un constante descenso en la condición física durante la reproducción que

llega a ser del 27% de la masa corporal inicial (Suárez *et al.* 2005). En el presente estudio, el detrimento de la condición corporal ocurre las hembras pero no en los machos, apoyando la idea de que las infecciones por parásitos de la malaria influyen en la condición del hospedador de manera diferente en machos y hembras, presumiblemente como resultado de una inversión diferencial en la reproducción en machos y hembras.

IV. ESTRATEGIAS DE APAREAMIENTO

Con el reciente y creciente desarrollo de las técnicas moleculares y su aplicación a la ecología cada vez son más los estudios que ponen de manifiesto las discrepancias entre el sistema de apareamiento social de las especies –basado en asociaciones observables entre individuos– y el sistema de apareamiento sexual o genético, entendido como el resultado de las fertilizaciones ocurridas entre individuos (Petrie y Kempenaers 1998, Griffith *et al.* 2002, Isvaran y Clutton-Brock 2007). En las aves, la mayor parte de las discrepancias entre las relaciones de tipo social y genético se deben a desviaciones respecto a lo establecido como monogamia social (Hasselquist y Sherman 2001, Griffith *et al.* 2002, Westneat y Stewart 2003). Muchos estudios, por ejemplo, han encontrado tasas variables de cópulas, fertilizaciones o paternidad fuera de la pareja en especies consideradas socialmente monógamas (Westneat y Webster 1994, Birkhead y Møller 1995, Westneat y Sherman 1997, Møller y Ninni 1998, Møller y Cuervo 2000, Hasselquist y Sherman 2001). Dentro del grupo de los passeriformes, por ejemplo, se estima que cerca del 11% de los pollos y del 19% de las polladas en especies consideradas como monógamas a nivel social son el resultado de paternidad fuera de la pareja (Griffith *et al.* 2002), valores que llegan a alcanzar en algunas especies el 55% de los pollos y el 86% de las polladas (Dixon *et al.* 1994).

Estas elevadas tasas de infidelidad pueden ser el resultado de una interpretación errónea del sistema de apareamiento observado, es decir, que lo que consideramos como monogamia social no lo sea realmente, o ser ciertamente el resultado de fertilizaciones fuera de la pareja en individuos socialmente monógamos. En algunos casos la falta de datos apropiados sobre el comportamiento de los individuos durante la reproducción puede haber contribuido a esta sorprendente promiscuidad sexual en especies socialmente monógamas. Por ejemplo, el tipo de apareamiento en muchas especies ha sido tradicionalmente definido en base a observaciones de campo de determinados comportamientos (guarda de la pareja, repetida presencia de machos cerca de los nidos, observaciones de machos visitando nidos, etc.) pero sin ningún tipo de certeza sobre la identidad de los individuos

implicados, ni un seguimiento continuado de los individuos durante la reproducción. Las inferencias realizadas con datos de este tipo pueden llevar a la clasificación errónea de especies o poblaciones como socialmente monógamas, con formación de parejas estables durante la reproducción, cuando realmente no lo son.

Determinados factores de tipo ecológico y ciertos rasgos de las estrategias vitales han sido propuestos como mecanismos causales para explicar la promiscuidad en las aves (véase una revisión en Griffith *et al.* 2002), entre los que cabe citar la densidad de reproductores (Møller y Birkhead 1993, Møller y Ninni 1998), la sincronía en la reproducción (Stutchbury y Morton 1995, Stutchbury 1998), mortalidad de adultos (Mauck *et al.* 1999, Wink y Dyrce 1999) o el cuidado parental (Birkhead y Møller 1996). Entre éstos, el cuidado parental es de los que mayor atención ha recibido por parte de los investigadores y su papel a la hora de explicar la promiscuidad en especies socialmente monógamas parece claro. Numerosos estudios confirman la íntima relación que existe entre el sistema de apareamiento y el tipo y cantidad de cuidado parental (Black 1996, Ligon 1999, Burley y Johnson 2002, Olson *et al.* 2009, Huck *et al.* 2014).

A este respecto apunta la teoría de la selección sexual. Robert Trivers (1972) propuso que en cada especie, los individuos pertenecientes al sexo que invirtiera más en la progenie elegirían a sus parejas, mientras que los pertenecientes al otro sexo competirían por el acceso a ellas y mostrarían una mayor variación en el éxito reproductivo. Por lo general, las hembras invierten más que los machos debido a los costos diferenciales de los gametos entre los sexos (Trivers 1972, Andersson 1994). El marco teórico generado por Trivers permite predecir que la elección de la pareja por parte de las hembras estará limitada porque el cuidado parental del macho ejerce una fuerte presión de selección sobre las preferencias de la hembra (Kirkpatrick 1985). Así, en especies con un alto grado de cuidado parental por parte del macho cabría esperar un alto grado de monogamia, mientras que en especies sin cuidado parental o donde éste es muy reducido los individuos podrían optar por diversas estrategias de apareamiento para tratar de maximizar su éxito reproductivo. En estos casos, la

poligamia es mas ventajosa que la monogamia, y existen numerosos ejemplos en la literatura sobre lo mucho que los machos tienen que ganar al copular con múltiples hembras. Sin embargo, son muchos menos los trabajos que demuestran que las hembras que se comportan así tengan beneficios, aunque algunos autores han confirmado que las hembras con varias parejas sexuales pueden obtener beneficios directos en términos de mejora de fecundidad y/o fertilidad (Arnqvist y Nilsson 2000) e indirectos a través de beneficios genéticos para sus pollos (Jennions y Petrie 2000). Otro aspecto importante a tener en cuenta en este tema y que ha sido poco explorado hasta la fecha es que el supuesto beneficio de la poligamia para los machos depende en gran medida de lo fieles que les sean sus parejas. Aparearse con varias parejas a la vez reporta beneficios obvios a los machos únicamente si sus parejas no actúan con terceros de la misma forma. Por lo tanto, para comprender cómo han evolucionado los sistemas de apareamiento en las aves es importante también considerar las estrategias de las parejas sexuales.

Debido a que las condiciones ecológicas locales (alimento, hábitat, competencia, depredación) pueden ejercer presiones selectivas sobre la elección de la pareja, y puesto que dichas condiciones varían a lo largo del tiempo y en el espacio, sería esperable la existencia de varias estrategias de apareamiento en una misma especie o incluso una misma población (estrategias mixtas). Por ejemplo, las condiciones – en cuanto a abundancia de alimento o incidencia de la depredación– presentes durante la reproducción para muchas especies de aves de zonas templadas muestran importantes variaciones estacionales (Verhulst y Nilsson 2008, Borgmann *et al.* 2013). En este tipo de contextos ecológicos sería esperable encontrar diversas estrategias de apareamiento en una misma población a lo largo de una misma temporada de reproducción. Sin embargo, los ejemplos de este tipo son escasos, siendo lo normal encontrar un solo tipo de relaciones (generalmente monogamia) entre los individuos de una misma población, a excepción de unos pocos casos descritos de poblaciones con sistemas de apareamiento variables (Davies 1985, Blackmore y Heinsohn 2008, Meng-Hua *et al.* 2009; Santos y Nakagawa 2013).

IV. ESTRATEGIAS DE APAREAMIENTO

Siguen siendo necesaria la investigación sobre este tema, con diferentes modelos de estudio y bajo diferentes presiones selectivas, para comprender en profundidad las condiciones bajo las cuales las diferentes estrategias de apareamiento (monogamia, poligamia, poliandria) son mas ventajosas y cómo la existencia de estrategias de apareamiento alternativas en una misma población puede ser evolutivamente estable. En este sentido, es fundamental no sólo describir los sistemas de apareamiento en las poblaciones sino también evaluar el éxito reproductivo obtenido por los individuos de ambos sexos bajo cada una de las estrategias.

En este bloque se estudian por primera vez las estrategias de apareamiento sexual del bisbita campestre en nuestras poblaciones de estudio, utilizando una aproximación genética (apartado IV.2. *Descripción de las estrategias de apareamiento genético*), así como el éxito reproductivo individual (como una medida de la aptitud o eficacia biológica) obtenido por los machos y las hembras que optan por cada una de las estrategias reproductivas encontradas en las poblaciones de estudio (apartado IV.3. *Éxito reproductivo en machos y hembras asociado a las estrategias de apareamiento*). Para llevar a cabo esta aproximación, y puesto que no existía información previa sobre la especie, ha sido necesario construir una librería de marcadores moleculares para el bisbita campestre, así como realizar pruebas cruzadas con marcadores aislados en otras especies para comprobar su utilidad en nuestra especie de estudio. Estos trabajos, encaminados a la puesta a punto de un panel de marcadores moleculares útiles en el bisbita campestre, aparecen detallados al principio de este bloque (apartado IV.1. *Aislamiento y optimización de un panel de marcadores moleculares*).

Los datos utilizados en este bloque han sido recopilados en las dos zonas de estudio (apartado II.2. *Áreas de estudio*). La metodología específica utilizada en este bloque aparece dentro de cada uno de los apartados correspondientes, mientras que los detalles relativos a la metodología general de campo y de laboratorio pueden consultarse en el bloque II (apartado II.3. *Metodología del trabajo de campo*, y apartado II.4. *Metodología del trabajo de laboratorio*). Los resultados que aparecen en este bloque de la tesis se encuentran ya publicados o en preparación para su publicación, bajo los títulos:

- a) Characterization of polymorphic microsatellite loci for the Tawny Pipit *Anthus campestris* and their utility in other steppe birds. Calero-Riestra, M., García, J.T., Herranz, J. y Suárez, F. 2013 *Journal of Ornithology*, 154: 289-298.
- b) Variable reproductive strategies in the socially monogamous Tawny pipit *Anthus campestris*. Calero-Riestra, M. y García, J.T. *Manuscrito en preparación*.
- c) Fitness consequences of male and female multiple mating and the evolution of promiscuity in Tawny pipit *Anthus campestris*. Calero-Riestra, M. y García, J.T. *Manuscrito en preparación*.

1. Aislamiento y optimización de un panel de marcadores moleculares

El género *Anthus* contiene 43 especies de passeriformes y sólo existe una especie para la que se hayan aislado marcadores microsatélites específicos, el bisbita llanero *Anthus spragueii*, en un trabajo publicado a lo largo del transcurso de esta tesis (Crawford et al. 2009). Previamente, el equipo del Dr. Juan Carlos Illera había utilizado cinco marcadores microsatélite aislados en otras especies de aves para un estudio sobre la genética de poblaciones en el bisbita caminero *Anthus berthelotti* (Illera et al. 2007), comprobando que dichos marcadores eran polimórficos en su especie de estudio. Para el resto de especies del grupo no existe información publicada, salvo los resultados del presente trabajo.

Los microsatélites son marcadores nucleares neutros (no sometidos a selección), de locus simple, que consisten en un tramo de ADN que contiene unos cuantos nucleótidos de longitud –de 2 a 6 pares de bases (bp)– que se repiten varias veces en tándem a lo largo de la cadena de ADN. Al ser de un tamaño relativamente pequeño pueden ser amplificados fácilmente mediante PCR. Son hipervariables, por lo que suelen mostrar decenas de alelos en un mismo locus que difieren entre sí en el número de repeticiones. Actualmente, siguen siendo los marcadores de elección para estudios de diversidad genética y para análisis de parentesco como los empleados en esta tesis.

El objetivo de este trabajo es el de aislar marcadores microsatélites específicos para el bisbita campestre y comprobar su utilidad en otras especies de aves esteparias para las que haya pocos o ningún marcador microsatélite disponible. Adicionalmente, se comprobó la utilidad de otros marcadores ya publicados y no específicos –desarrollados para otras especies de aves– en el bisbita campestre, con el objetivo de completar una colección de marcadores informativos que puedan ser utilizados en estudios de parentesco o de genética de poblaciones en el bisbita campestre y especies afines.

1.1. Metodología

Toda la metodología que se describe a continuación, incluida la secuenciación y el genotipado de las muestras, ha sido realizada íntegramente por M. Calero-Riestra en los laboratorios del IREC.

1.1.1. Creación de una librería de microsatélites

Para el desarrollo de marcadores microsatélites se construyó una librería genómica enriquecida con repeticiones de (GATA)₇, (AAAG)₇, (AC)₁₃, (AGC)₈ y (GAT)₈ según el procedimiento modificado de otros autores (Hamilton *et al.* 1999). Para construir la genoteca se partió de una muestra (50 µg) del ADN extraído de las muestras de sangre que fue digerido con 150 unidades de cada una de las siguientes enzimas de restricción: AluI, BspLI, RsaI, HincII, Bsh1236I y BsuRI (Fermentas). El ADN de los fragmentos resultantes, con tamaños entre 500 y 3000 pares de bases (pb), fue extraído gracias a un kit de extracción comercial (*QIAquick Gel Extraction Kit*, Qiagen). Los fragmentos de ADN se desfosforilaron mediante fosfatasa alcalina (Fermentas) y se unieron a los adaptadores SNX linkers (Hamilton *et al.* 1999). Posteriormente, el ADN purificado se hibridó con oligonucleótidos de motivos microsatélites marcados con biotina. El ADN que contenía los fragmentos con las secuencias repetitivas se capturó con esferas magnéticas cubiertas con streptavidina (Dynabeads M-280 Streptavidin, Invitrogen) para ser amplificado posteriormente en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el cebador SNX-F. El ADN amplificado en esta reacción se ligó al lugar XbaI del plásmido pUC19 (Fermentas), y el plásmido resultante se utilizó para incorporarlo a células electrocompetentes (ElectroTen-Blue) de *Escherichia coli* mediante electroporación. Las bacterias transformadas se sembraron en un medio de agar LB y se transfirieron a membranas de nylon hibridadas con los motivos de los microsatélites marcados con digoxigenina (DIG). Los positivos con insertos de un rango entre 300 y 700 pb fueron secuenciados con el cebador M13 y un kit comercial (BigDye Terminator kit version 3.1) en un secuenciador modelo ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems).

IV. ESTRATEGIAS DE APAREAMIENTO

Se secuenciaron un total de 92 clones positivos, y las secuencias se editaron manualmente utilizando el programa BioEdit 7.0.4.1 (Hall 1999). De éstos, 58 clones contenían secuencias repetitivas microsatélites. Se eligieron 21 de estos clones para diseñar los cebadores, utilizando el programa PRIMER3 (Rozen y Skaletsky 2000). El resto de secuencias se descartaron debido a la presencia de secuencias de repetición muy irregulares y/o demasiado largas. Las PCR's de amplificación de los fragmentos microsatélites consistieron en una desnaturalización inicial de 3 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a la temperatura de alineamiento (Tabla IV.1) y 30 segundos a 72°C, más una fase de extensión final de 10 minutos a 72°C. Todas las PCR's se realizaron en termocicladores modelo 2720 (Applied Biosystems). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 10 µl y contuvieron 1.5–2.5 mM MgCl₂ (Tabla 1), 0.25 unidades de Taq DNA polimerasa (Biotools), 0.5 µM de cada cebador, 0.125 mM de cada dNTP y 25–50 ng de ADN genómico. Se utilizaron cebadores reversos marcados con fluorescencia en su extremo 5' (6-FAM, NED, PET o VIC; ver Tabla IV.1). Los productos de la amplificación se genotiparon en un secuenciador ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems). El tamaño de los alelos se determinó a partir de un marcador estándar GeneScan 500-LIZ y se analizaron utilizando el programa GeneMapper version 4.0 (Applied Biosystems).

El nivel de polimorfismo de los 21 microsatélites aislados en *A. campestris* se comprobó en una muestra de 47–51 adultos capturados en 2007 en la población reproductora de Layna. Se determinó el sexo de los individuos según lo indicado en el apartado de metodología general (apartado II.4.1. *Extracción de ADN y sexado molecular*).

1.1.2. Realización de pruebas cruzadas entre especies

La utilidad de los marcadores aislados y puestos a punto para el bisbita campestre (apartado anterior) se comprobó en otras 17 especies de aves (en una muestra de tres individuos por especie; ver Tabla IV.2) utilizando las mismas condiciones que se han descrito en el apartado anterior. De este grupo de especies únicamente en tres se habían realizado previamente estudios mediante la amplificación de

microsatélites: alondra común *Alauda arvensis* (Hutchinson y Griffith 2008), collalba gris *Oenanthe oenanthe* (Kudernatsch *et al.* 2009) y alondra ricotí *Chersophilus duponti* (Méndez *et al.* 2010). Por otro lado, se probaron 24 marcadores microsatélite no específicos (es decir, aislados y testados en otras especies de aves) en el bisbita campestre (Tabla IV.1). Entre estos marcadores no específicos se amplificaron con éxito siete aislados en el diamante mandarín *Taeniopygia guttata* (Dawson *et al.* 2010) y uno en el bisbita llanero *Anthus spragueii* (Crawford *et al.* 2009) que fueron publicados durante el transcurso de esta tesis (Tabla IV.1).

Se revisaron los errores genotípicos, como la presencia de alelos nulos, la existencia de bandas “sombra” repetidas (*stuttering*) y la pérdida de alelos (*drop-out*), utilizando el programa MICRO-CHECKER (Oosterhout *et al.* 2004). Para cada locus se calcularon los valores de diversidad genética: número de alelos (N_A), heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) y el índice de fijación (F_{IS}) con el programa GENEPOP 4.0 (Rousset 2008). Además, se determinó si existía ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento mediante el logaritmo de la verosimilitud (1,000 dememorizaciones, 200 lotes y 1,000 iteraciones por lote) con el programa GENEPOP 4.0 (Raymond y Rousset, 1995), utilizando un nivel de significación de 0.05, o bien el valor obtenido después de la corrección secuencial de Bonferroni (Holm 1979).

Por último, de entre todos los marcadores probados se seleccionó un lote con los 16 loci que ofrecieron los mejores resultados en el bisbita campestre para su posterior utilización en los análisis de parentesco (apartados IV.2 y IV.3 de este bloque). Para todos los marcadores de dicho lote se calcularon los valores de diversidad genética antes citados en cada una de las poblaciones de estudio, sobre una muestra de 65 (Layna) y 104 (Valeria) adultos. Los resultados al respecto se muestran en la tabla IV.3.

1.2. Resultados

De los 21 loci microsatélite aislados en el bisbita campestre seis fueron marcados inequívocamente y cuatro de ellos resultaron polimórficos en nuestra población de estudio (Tabla IV.1). Dos de los loci consistieron en repeticiones de dinucleótidos, uno en repeticiones de un trinucleótido, otros dos consisten en repeticiones de tetranucleótidos y uno en repeticiones de pentanucleótidos (Tabla IV.1). Para los 4 microsatélites que resultaron polimórficos se han detectado un total de 59 alelos, con un rango de variación de entre 7 y 23 alelos por locus. La heterocigosidad observada y esperada varía entre 0.286 y 0.936, y entre 0.558 y 0.938, respectivamente (Tabla IV.1). No se han detectado desviaciones significativas respecto al equilibrio Hardy-Weinberg o desequilibrio de ligamento excepto para el locus *Aca21*, que muestra un exceso significativo de homocigotos ($F_{is} = 0.496$, $p < 0.001$). En este locus también se ha detectado la presencia de alelos nulos.

Todas las hembras ($n = 22$) resultaron ser homocigotas para el locus *Aca8*. Análisis más detallados sobre su descendencia y de los machos por separado (Tabla IV.1) sugieren que este marcador está ligado al cromosoma sexual Z.

Los 6 loci aislados en bisbita campestre se probaron en 17 especies de aves esteparias pertenecientes a 6 familias distintas (Tabla IV.2). De este grupo de especies únicamente en tres se habían realizado previamente estudios mediante la amplificación de microsatélites: Alondra común *Alauda arvensis* (Hutchinson y Griffith 2008), Collalba gris *Oenanthe oenanthe* (Kudernatsch *et al.* 2009) y Alondra ricotí *Chersophilus duponti* (Méndez *et al.* 2010). Los resultados de las pruebas cruzadas con los 6 loci aislados en bisbita campestre indican que las 17 especies consideradas pueden ser amplificadas con al menos uno de los microsatélites aislados en el bisbita campestre, excepto la ganga ibérica *Pterocles alchata*, para la que ningún marcador funcionó con éxito (Tabla IV.2). Los marcadores más útiles fueron *Aca9* y *Aca21*, que produjeron amplificaciones con éxito en 10 y 14 especies, respectivamente. Por el contrario, *Aca5* mostró bandas no específicas

Especie	Locus	Secuencia del cebador (5'-3')	Referencia	Repetición	Tº	MgCl ₂	Tamaño
<i>Anthus campestris</i> (este estudio)	<i>Aca2</i>	F: AAGGAGGGTGGGTTTCAGAGT R: 6FAM-ACCCACAAGCTGAACTCTGT	HM136874	(TGC) ₈	58	2	103-157
	<i>Aca9</i>	F: TGGACCTCTTGAGAGCAGTG R: 6FAM-CTGCATTTCTACCCGTGATG	HM136878	(ATCC) ₁₅	49	2	199-257
	<i>Aca8</i>	F: TATCCCACATCTCTGTGAGC R: VIC-AGAGGAGAGGAGCAGAGTCC	HM136877	(CTATT) ₉	58	2	190-220
	<i>Aca21</i>	F: GCTCTCCAGGTGATGGTCCT R: PET-TCCATGCCCTTGCCACAGT	HM136879	(GGAT) ₂₅	49	2	121-219
	<i>Aca3</i>	F: GTTAAAAATCTATGCATCCAGC R: NED-ACTGAAAAAGCTGCAGACACAC	HM136875	(CA) ₁₉	46	1.5	155
	<i>Aca5</i>	F: GCAAATCTGCGTGTGTGA R: NED-TGCTCATACACTACCTGAGCAGA	HM136876	(GT) ₄₇	40	2	170
<i>Ficedula hipoleuca</i> (Primmer <i>et al.</i> 1996)	<i>Fhμ2</i>	F: GTGTTCTTAAACATGCCTGGAGG R: VIC-GCACAGGTAAATATTGCTGGGCC			55	1.5	127-141
<i>Acrocephalus arundinaceus</i> (Hansson <i>et al.</i> 2000)	<i>Aar8</i>	F: TAGTGATGCCCTGCTAGGTA R: NED-AAGTGCTCCTTAATATTGGCA			55	1.5	87
<i>Malurus cyaneus</i> (Double <i>et al.</i> 1997)	<i>Mcyμ4</i>	F: ATAAGATGACTAAGGTCTCTGGTG R: PET-TAGCAATTGTCTATCATGGTTTG			55	1.5	134-167

Tabla IV.1. Loci microsatélite aislados en el bisbita campestre y en otras especies de aves y que han sido probados en el bisbita campestre por primera vez en este trabajo. Se muestra la secuencia de los cebadores, el número de referencia en GenBank, el motivo de repetición, la temperatura de alineamiento, la concentración de sales y el tamaño de los alelos.

<i>Pica pica</i> (Martinez et al. 1999)	<i>Ppiz</i>	F: CACAGACCATTGGAAGCAGA R: NED-GCTCCGATGGTGAATGAAGT	50	1.5	234-260
<i>Parus domesticus</i> (Griffith et al. 1999)	<i>Pdop5</i>	F: GATGTTGCAGTGACCTCTCTTG R: VIC-GCTGTGTTAATGCTATGAAAATGG	50	1.5	200-236
<i>Catharus ustulatus</i> (Gibbs et al. 1999)	<i>Cu10</i>	F: AAAATGAGGAGAATACTAGGCA R: 6FAM-ACTTATTTTCAGTCCTAAATTCACC	46	2.5	138-199
<i>Acrocephalus sechellensis</i> Richardson et al. 2000)	<i>Ase19</i>	F: TAGGGTCCCAGGGAGGAAG R: NED-TCTGCCCATAGGGAAAAGTC	55	2	157-167
<i>Poecile atricapillus</i> (Otter et al. 1998)	<i>PAT MP2-43</i>	F: ACAGGTAGTCAGAAATGGAAAG R: NED-GTATCCAGAGTCTTTGCTGATG	53	2.5	120-128
<i>Taeniopygia guttata</i> (Dawson et al. 2010)	<i>TG01-147</i>	F: TGAGCCACTACAGAGTGGA R: GCCACTACAATGAAGAAAATATTACAG	50	1.5	256-274
	<i>TG02-088</i>	F: TGTGTGTTGACAGTATTCTCTTGC R: TTAAACCTAATAAACGTCACACAGTC	50	1.5	246-266
	<i>TG03-002</i>	F: TCTTGCTTTTTTGGTATGAGTATAG R: TACAAAGCACTGTGGAGCAG	50	1.5	118-139
	<i>TG04-004</i>	F: CTGGAGCAGTATTTATATTGATCTTCC R: GAAGATGTGTTTCACAGCATAACTG	50	1.5	151-175
	<i>TG04-012</i>	F: TGAATTTAGATCCTCTGTTCTAGTGTC R: TTACATGTTTACGGTATTTCTCTGG	50	1.5	130-138
	<i>TG05-053</i>	F: GCATCATCTGGTTGAACTCTC R: ACCCTGTTTACAGTGAGGTGTT	50	1.5	154-231
	<i>TG06-009</i>	F: AAGCCTTGCTTACATTTTATGGTG R: GGGGTGGTAACTGAAATAAAGTATAGG	50	1.5	115-123
<i>Anthus spinoleta</i> (Crawford et al. 2009)	<i>AnSp112</i>	F: ACCAACGCAGTGTAGAGAC R: TTCCATCACCCACAACCCC	50	1.5	122-170

Tabla IV.1. Continuación. Loci microsatélite aislados en el bisbita campestre y en otras especies de aves y que han sido probados en el bisbita campestre por primera vez en este trabajo.

para la mayor parte de especies estudiadas (Tabla IV.2). Pese a que los niveles de variabilidad de los marcadores aislados en el bisbita no han sido analizados en este grupo de especies, este trabajo proporciona los primeros marcadores potenciales para futuros estudios de parentesco y genética de poblaciones en dichas especies.

Respecto a los 24 loci desarrollados para otras especies de aves y probados en el bisbita campestre, ocho de ellos fueron descartados por la presencia de dobles picos en los cromatogramas (Locus *Lox8*, referencia GenBank: Y16825) o amplificaciones nulas (*HrU5*: X84090, *HrU7*: X84092, *Pca4*: AJ279806, *Pca7*: AJ279809, *PmaC25*: AY260526, *Phtr2*: EF621527, *Cu04*: AF122891). Los restantes loci fueron correctamente genotipados y la mayor parte resultaron ser polimórficos en la población estudiada (Tabla IV.1).

Globalmente se han obtenido un total de 16 loci microsatélite funcionales cuyo nivel de polimorfismo varía considerablemente entre loci (N_A varía entre 3 y 26, y *PIC* entre 0.06 y 0.93) pero que es similar entre ambas poblaciones, con valores medios para el número de alelos de 9.4 en Layna, y de 9.3 en Valeria (Tabla IV.3). Los errores de genotipado varían entre 0 y 0.12 (media \pm sd: 0.03 \pm 0.04) y la pérdida de alelos entre 0 y 0.13 (0.03 \pm 0.04). El locus *Fh μ 2* muestra indicios de bandas-sombra (*stuttering*) en las muestras de Valeria y el locus *Ase19* presencia de alelos nulos también en Valeria. No existen evidencias de que los errores genotípicos puedan afectar al genotipado en el resto de marcadores. Tampoco se ha detectado desequilibrio de ligamiento entre loci, y las desviaciones respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg se han detectado en seis de los loci pero nunca en ambas poblaciones para un mismo locus (Tabla IV.3).

IV. ESTRATEGIAS DE APAREAMIENTO

Especies	Familia	Locus					
		Aca2	Aca9	Aca8	Aca21	Aca3	Aca5
<i>Motacilla alba</i>	Motacillidae	+	-	-	-	-	-
<i>Alauda arvensis</i>	Alaudidae	+	+	+	+	i	i
<i>Alaemon alaudipes</i>		-	-	+	+	+	i
<i>Calandrella brachydactyla</i>		-	+	-	+	-	i
<i>Calandrella rufescens</i>		-	+	+	+	i	-
<i>Chersophilus duponti</i>		+	+	-	+	-	i
<i>Eremophila bilopha</i>		-	+	+	+	+	i
<i>Galerida cristata</i>		-	+	+	+	+	i
<i>Galerida theklae</i>		+	+	+	+	i	i
<i>Ramphocoris clotbey</i>		+	+	+	+	-	i
<i>Oenanthe hispanica</i>	Muscicapidae	+	-	-	+	+	-
<i>Oenanthe oenanthe</i>		-	-	+	+	i	i
<i>Oenanthe deserti</i>		+	+	+	+	i	-
<i>Cursorius cursor</i>	Glareolidae	-	+	-	-	+	i
<i>Pterocles alchata</i>	Pteroclididae	-	-	-	-	-	-
<i>Pterocles orientalis</i>		-	-	-	+	+	i
<i>Tetrax tetrax</i>	Otididae	+	-	-	+	i	i

Tabla IV.2. Pruebas cruzadas de los loci microsatélite aislados en el bisbita campestre en 17 especies de aves esteparias. Se muestran las amplificaciones resultaron positivas (+), negativas (-) y las amplificaciones inespecíficas (i)

IV. ESTRATEGIAS DE APAREAMIENTO

Locus	Layna (n = 65)				Valeria (n = 104)			
	H _E	H _O	N _A	PIC	H _E	H _O	N _A	PIC
Aca2	0.811	0.815	17	0.80	0.826	0.800	14	0.80
Ase19	0.074	0.077	5	0.13	0.065	0.048	4	0.06
PAT MP 2-43	0.257	0.234	6	0.27	0.329*	0.267	4	0.30
McyU4	0.875*	0.778	16	0.86	0.895	0.818	15	0.88
Pdoμ5	0.557	0.615	11	0.53	0.564*	0.544	15	0.54
Ppi2	0.881	0.813	14	0.88	0.896	0.802	14	0.88
Aca9	0.929*	0.950	26	0.93	0.934	0.822	26	0.92
Fhμ2	0.581*	0.641	8	0.50	0.560	0.471	7	0.48
TG01-147	0.446	0.469	5	0.41	0.485	0.485	3	0.41
TG02-088	0.136	0.143	4	0.13	0.227	0.228	5	0.22
TG03-002	0.537	0.5	5	0.49	0.510*	0.466	7	0.46
TG04-004	0.228	0.250	5	0.22	0.188	0.204	4	0.18
TG04-012	0.448	0.516	4	0.40	0.534	0.515	5	0.45
TG05-053	0.841	0.892	12	0.82	0.845	0.883	13	0.82
TG06-009	0.105	0.109	3	0.10	0.094	0.097	4	0.09
AnSp112	0.689	0.688	9	0.64	0.690	0.637	8	0.64
Media	0.525	0.531	9.4	0.51	0.540	0.505	9.3	0.51
sd	0.298	0.292	6.3	0.29	0.295	0.275	6.3	0.29

Tabla IV.3. Diversidad genética en las dos poblaciones de estudio para el panel de 16 loci microsatélite utilizados en esta tesis. Se muestran los valores de heterocigosidad esperada (H_E) y observada (H_O), número de alelos (N_A) y el contenido en información polimórfica (PIC). Las desviaciones respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg se indican en la tabla con un asterisco.

2. Descripción de las estrategias de apareamiento

En este apartado se estudia el sistema de apareamiento del bisbita campestre en ambientes estacionales mediterráneos desde un punto de vista genético. A pesar de que la especie está considerada como monógama a nivel social (del Hoyo *et al.* 2004), algunas características de la especie que se ajustan mejor a un sistema de apareamiento genético polígamo, o cuanto menos mixto, a lo largo de la temporada de reproducción, como la ausencia de cuidado parental por parte de los machos, las altas tasas de puestas de reposición y la estrecha relación entre el momento de reproducción y las tasas de depredación de nidos (véanse resultados del bloque III. *Reproducción, depredación y parásitos*). Evaluamos esta posibilidad mediante el estudio detallado de las relaciones de parentesco en la población, tanto entre pollos como entre pollos y adultos. De esta manera se puede cuantificar la cantidad de parejas sexuales con las que cada macho y cada hembra han producido fertilizaciones exitosas (pollos nacidos). Se utilizan datos recogidos a lo largo de 4 años (2007 a 2010) en las dos poblaciones de estudio.

2.1. Determinación de parentesco, descripción de las variables y métodos estadísticos

Para estudiar las relaciones de parentesco todas las muestras se genotiparon para los 16 marcadores microsatélites puestos a punto para el bisbita campestre (apartado IV.1. *Aislamiento y optimización de un panel de marcadores moleculares*). Los análisis de parentesco se realizaron mediante el método de máxima verosimilitud implementado en el programa COLONY 2.0 (Jones y Wang 2010). Este método es particularmente apropiado para nuestros datos pues permite utilizar información sobre los potenciales padres para inferir de forma simultánea los grupos de hermanos y de padres-hijos relacionados, además de que admite tasas variables de errores genotípicos debidos a la presencia de alelos nulos o al *stuttering*. Además, el hecho de poder

examinar de forma simultánea a todos los padres y pollos, hace que mejore la probabilidad de detectar los dos alelos parentales y, por tanto, de una mayor precisión a la hora de inferir las relaciones de parentesco.

La determinación del parentesco en los análisis se ha realizado sin asignación apriorística de los pollos a la madre social (la madre capturada en el nido). Los análisis en COLONY se han realizado para cada estación reproductiva bajo el criterio no restrictivo de un escenario poliginándrico (es decir, que tanto el macho como la hembra pueden ser polígamos en la población). Todos los análisis se han realizado según el método de máxima verosimilitud y alta precisión en COLONY, que incluye estimas de endogamia, tres carreras del programa de longitud media y sin priors.

En la población de Layna los padres candidatos para los análisis fueron todos los adultos capturados durante el año de estudio (2007). La probabilidad de que el verdadero padre y la verdadera madre estén incluidos en la muestra se estimó en base a las observaciones de campo, y se ajustó en el programa COLONY a 0.3 y 0.5, respectivamente.

En la población de Layna, todos los adultos capturados entre 2008 y 2010 y todos los pollos nacidos en años previos fueron incluidos como padres potenciales de un determinado año. La probabilidad de que el verdadero padre y madre de un pollo estén contemplados dentro de la muestra de candidatos se fijó en 0.40 y 0.95, para el año 2008; 0.50 y 0.95, para 2009; 0.60 y 0.95, para el año 2010, respectivamente.

Se han utilizado las opciones “*Paternity*”, “*Maternity*”, and “*Best configuration*” en el programa COLONY 2.0 (Wang 2004, Wang y Santure 2009) para calcular el padre y la madre mas probable de cada pollo y su probabilidad asociada, reteniendo únicamente aquellas asignaciones de paternidad con una verosimilitud ≥ 0.95 .

El software también ofrece el nivel de certidumbre para subestructuras genéticas particulares. Hemos utilizado esta opción para determinar, en cada uno de los nidos estudiados, la probabilidad de que los pollos de la pollada compartieran ambos padres, un solo padre o ninguno. De esta forma, cada nido encontrado fue incluido en una de las siguientes categorías: polladas formadas en su totalidad por hermanos de padre y madre (*FS*: de sus siglas en inglés *full sibling*), polladas que

contuvieron pollos medio-hermanos, ya fuesen hermanos por parte de madre (*MHS; mother half-siblings*), o hermanos por parte de padre (*FHS; father half-sibling*), y polladas en los que ninguno de los pollos compartían parentales (*US, unrelated siblings*). Los nidos se clasificaron en función del nivel de confianza respecto a la probabilidad de que exista una de estas subestructuras genéticas en la pollada, según los resultados obtenidos del programa COLONY 2.0. En concreto, se tuvieron en cuenta los nidos con una probabilidad de subestructura mayor del 95% y nidos con una probabilidad mayor del 80%, mientras que los nidos con una probabilidad de subestructura genética menor del 80% fueron descartados para los análisis.

La paternidad y la maternidad múltiple se definen en este trabajo como la existencia de varias parejas genéticas solapadas en el tiempo, es decir, que un individuo tenga descendientes con dos o mas individuos del sexo opuesto a la vez y en la misma temporada de reproducción. Por lo tanto, en este trabajo diferenciamos la *monogamia sucesiva*, cuando existe apareamientos con mas de un individuo en una misma temporada de reproducción, pero con una pareja al tiempo. Este sería el caso de una hembra que realiza una segunda puesta con un macho diferente al de la primera puesta. Sin embargo, el apareamiento múltiple consiste en tener varias parejas genéticas de forma solapada en el tiempo, y sus implicaciones a nivel comportamental y evolutivo son diferentes. Para comprobar el posible solapamiento en el tiempo de las parejas genéticas se ha considerado la duración de un evento de reproducción como el periodo de tiempo transcurrido entre el inicio de las actividades de nidificación (4 días antes de la fecha de puesta del primer huevo) y el momento en que los pollos abandonan el nido (24 días tras la puesta del primer huevo; Calero-Riestra et al. 2014) o hasta que el nido fracase.

2.2. Resultados

De los 96 nidos de los que se obtuvieron datos a lo largo de los 4 años de trabajo de campo (Tabla IV.4), en 82 de ellos se obtuvieron muestras de sangre de la pollada completa, sumando un total de 312 pollos para los análisis genéticos. En los análisis de parentesco se incluyeron como padres potenciales 93 machos adultos (31 de ellos capturados en Layna y 62 en Valeria) y 76 hembras adultas (34 en Layna y 42 en Valeria).

2.2.1. Análisis basados en las polladas

De las 82 polladas analizadas, 56 (68.3%) mostraron una probabilidad de subestructura del nido con un nivel de confianza del 95% y 62 polladas (76.8%) una probabilidad de subestructura con un nivel de confianza del 80%.

A nivel individual, el 77% de los pollos analizados (239 de 312) provinieron de polladas con probabilidad de subestructura del 80% y un 69% (214 de 312) de polladas con probabilidad de subestructura del 95%. La frecuencia de cada pollada y de cada categoría de pollos (*FS*, *MHS*, *FHS* y *US*) no difiere significativamente en función de si se utiliza un nivel de confianza u otro (prueba de chi-cuadrado: $p > 0.45$ en todos los casos) y, por tanto, no parece que el hecho de adoptar un nivel

Año	N	Completas	P80	P95
2007	32 (107)	26 (96)	18 (66)	15 (54)
2008	19 (77)	15 (59)	14 (55)	13 (50)
2009	26 (99)	24 (92)	19 (73)	18 (69)
2010	19 (73)	17 (65)	12 (46)	11 (42)

Tabla IV.4. Número de nidos y número de pollos (valores entre paréntesis) estudiados, número de polladas completas consideradas en los análisis. Las dos columnas de la derecha se corresponden con el tamaño muestral de nidos y pollos incluidos en cada una de las categorías de probabilidad asignadas por el programa COLONY (*P80*: nivel de confianza del 80% y *P95*: confianza del 95%)

IV. ESTRATEGIAS DE APAREAMIENTO

de significación u otro haga variar de forma sustancial los resultados. Así pues, y con el fin de aumentar ligeramente el tamaño muestral y proporcionar un muestreo algo más completo de las polladas y de la prole (6 polladas y 25 pollos más con P_{80} que con P_{95}), se ofrecen los resultados incluyendo todas las polladas y pollos dentro del nivel de confianza del 80%.

El programa utilizado asignó la paternidad y la maternidad a un total de 239 pollos distribuidos en 62 polladas completas, que fueron producidos por 75 machos diferentes (32 muestreados y 43 no muestreados) y 72 hembras diferentes (57 muestreadas y 15 no muestreadas). El primer resultado que llama la atención es que la madre social, considerada ésta como la madre capturada cuando atendía al nido, no es la madre real de todos los pollos en los nidos. Sólo se confirmó como madre genética de la pollada completa en el 83.7% de los casos (170/203 pollos distribuidos en 53 polladas). Los restantes 33 pollos, pertenecientes a 18 polladas (34%), son hijos de madre diferente a la social. En 4 de estas 18 polladas (dos polladas en Layna de la cohorte de 2007, y dos polladas de Valeria de la cohorte de 2008) ninguno de los pollos resultó ser hijo de la madre social. En una pollada, sólo uno de los cuatro pollos que la componían pudo ser asignado a la madre social. En el resto de casos (13 polladas), la madre social resultó ser la madre genética de la mayor parte de la pollada, pero ésta también contenía pollos de otras madres (madres parásitas o cuasi-parásitas). Así pues, la mayor parte de las hembras en nuestras poblaciones cuidan exclusivamente de su propia prole, pero también existen hembras que atienden nidos en los que hay algún pollo ajeno e incluso hembras que atienden nidos en los que la pollada al completo le es ajena.

2.2.2. Relaciones de parentesco entre pollos de un mismo nido

El número de nidos en los que todos los pollos resultaron ser hermanos de padre y madre (FS) fue de 24, lo que representa un 38.7% respecto de las 62 polladas analizadas (Tabla IV.5). Esta categoría engloba al 74.05% de todos los pollos (177 de 239 analizados). La media de pollos por nido en los nidos incluidos en esta categoría fue de 3.81 ± 0.93 , con

un máximo observado de 5 pollos por nido. El resto de las polladas (38 de 62, el 61.3% del total) estuvo compuestas por pollos medio-hermanos de padre (*FHS*), medio-hermanos de madre (*MHS*), no relacionados (*US*) o combinaciones de cualquiera de las categorías anteriores. La distribución de polladas y pollos por cada categoría se muestra en la tabla IV.5.

El porcentaje de polladas en las que todos los pollos resultaron ser hermanos de padre y madre fueron mas abundantes en Valeria que en Layna (45.4% y 22.2%, respectivamente) pero las diferencias entre las dos localidades estudiadas no son estadísticamente significativas ($\chi^2_1 = 1.83$, $p = 0.17$). La abundancia de este tipo de polladas tampoco fue significativamente diferente entre años en Valeria ($\chi^2_2 = 0.65$, $p = 0.72$).

Se han detectado 39 (16.3%) pollos medio-hermanos por parte de madre distribuidos en 31 polladas, lo que representa el 50.0% de todas las polladas analizadas (Tabla IV.5). En una gran proporción de estas polladas existe un único pollo resultado de la fertilización de la hembra por un macho diferente al del resto de pollos del nido, aunque en 4 polladas (12.9%) se han detectado pollos de tres machos diferentes. Esta clase de polladas son mas abundantes en Layna que en Valeria, aunque no de forma significativa (66.7% y 42.2%, respectivamente; $\chi^2_1 = 2.17$, $p = 0.14$). En Valeria, la abundancia de esta categoría de nidos no varía de forma significativa entre años ($\chi^2_2 = 0.17$, $p = 0.92$).

Casos de pollos que resultaron ser medio-hermanos de padre con el resto de los pollos del nido se encontraron en 9 de las 62 polladas

	Layna		Valeria	
	Pollos	Polladas	Pollos	Polladas
Hermanos de padre y madre (FS)	44 (66.7)	4 (22.2)	133 (76.9)	20 (45.4)
Hermanos de madre (MHS)	14 (21.2)	12 (66.7)	25 (14.4)	19 (43.2)
Hermanos de padre (FHS)	4 (6.1)	4 (22.2)	5 (2.9)	5 (11.4)
No relacionados (US)	4 (6.1)	4 (22.2)	10 (5.8)	8 (18.2)
Tamaño muestral	66	18*	173	44*

Tabla IV.5. Número y porcentaje (entre paréntesis) de pollos y de polladas de bisbita campestre según las relaciones de parentesco dentro del nido en ambas poblaciones de estudio. El tamaño de muestra hace referencia al número total de pollos y nidos analizados.

consideradas en los análisis (14.51%). En todos los casos detectados sólo hubo un pollo de este tipo dentro de la pollada. La proporción de esta categoría es similar en las dos localidades estudiadas ($\chi^2_1 = 0.55$, $p = 0.46$) y no hubo diferencias significativas entre años para Valeria ($\chi^2_2 = 2.06$, $p = 0.36$).

Finalmente, los análisis permitieron detectar 14 (5.8%) pollos no relacionados con los del resto de la pollada, distribuidos en 12 (19.3%) polladas diferentes. De éstas, 10 contenían un único pollo de estas características, mientras que las otras dos polladas contenían dos pollos no relacionados con el resto. En ambos casos, los dos pollos no relacionados de cada nido procedían de madres distintas. La proporción de pollos no relacionados fue similar en las dos localidades de estudio ($\chi^2_1 = 0.003$, $p = 0.96$, Tabla IV.5), con variaciones entre años que no llegan al nivel de significación ($\chi^2_2 = 5.73$, $p = 0.06$).

2.2.3. Relaciones genéticas entre los parentales

Durante los 4 años de estudio se han identificado 75 machos diferentes que resultaron ser padres de alguno de los pollos en nuestras poblaciones de estudio. De éstos, 32 machos son individuos capturados en el campo y 43 han sido identificados por el programa COLONY (genotipo inferido por el programa, véase apartado IV.2.1. *Determinación de parentesco, descripción de las variables y métodos estadísticos*). En Valeria, donde se estudió la población durante tres años consecutivos, 15 de los 28 machos capturados con genotipo conocido (53.6%) tuvieron al menos un pollo en una única temporada de reproducción, otros 10 machos (35.7%) tuvieron descendientes en dos temporadas distintas, y 3 machos (10.7%) tuvieron descendencia en las tres temporadas de estudio. Se han detectado únicamente tres casos en los que el mismo macho tiene pollos con la misma hembra en mas de una temporada de reproducción. Los machos cuyo genotipo fue inferido por el programa COLONY no se tuvieron en cuenta a la hora de realizar estos cálculos entre años, puesto que la reconstrucción de los genotipos se basa en las frecuencias alélicas de la progenie cada año y, por tanto, la identificación de los individuos no debe usarse en diferentes años.

Teniendo en cuenta las dos zonas de estudio y que algunos machos repiten paternidad en varios años, el tamaño de muestra en cuanto a eventos reproductivos para los machos fue de 83. Esto quiere decir que nuestro lote de datos incluye a 75 machos y 83 eventos de apareamiento con hembras. Observamos que estos machos produjeron descendientes con un número variable de hembras en una misma temporada de reproducción: con una hembra en 44 casos (53.1%), con dos hembras en 27 casos (32.5%), con tres hembras en 9 ocasiones (10.8%), con cuatro hembras en 2 casos (2.4%) y con 5 hembras diferentes en una ocasión (1.2%). La mayoría de estos apareamientos ocurre de forma simultánea (82.9%) en forma de apareamientos múltiples (un macho produce descendientes con mas de una hembra a la vez en una misma temporada de cría). En el 17.1% de los casos son eventos secuenciales (apareamientos con hembras distintas en una misma temporada pero de forma no solapada). De los casos detectados de apareamiento múltiple, en seis de ellos el macho produjo descendientes con la misma hembra en dos polladas diferentes, en la mayoría de las ocasiones ($n=5$) después de que el primer nido fuese depredado.

Respecto a las hembras, los análisis confirmaron la maternidad de al menos un pollo por 73 hembras diferentes, 56 capturadas (genotipo conocido) y 16 de genotipo inferido por el programa COLONY. Siete de las 46 hembras capturadas Valeria (15.2%) tuvieron algún pollo en dos temporadas de reproducción, y únicamente una hembra (2.2%) tuvo pollos en los tres años que duró el estudio. El resto de hembras (82.6%) tuvo descendientes en una única temporada de cría. El tamaño muestral para las hembras es, por tanto, de 82 apareamientos. Los análisis demuestran que una misma hembra puede ser fertilizada por hasta 5 machos diferentes en una misma temporada de reproducción. Del total de las 73 hembras y 82 apareamientos identificados genéticamente, únicamente 28 apareamientos (34.5%) llevados a cabo por 27 hembras (37%) produjeron pollos de un único padre en la misma temporada de cría. En 37 (45.2%) eventos reproductivos en los que participaron 34 hembras diferentes (46.6%) los pollos pertenecieron a dos padres diferentes. En 13 eventos (15.8) llevados a cabo por 13 hembras (17.8%) los pollos tuvieron tres padres diferentes durante la misma temporada,

IV. ESTRATEGIAS DE APAREAMIENTO

mientras que 4 eventos (4.87%) de 4 hembras (5.5%) fueron con cuatro machos diferentes y sólo un evento de reproducción se produjo con 5 machos diferentes en una misma temporada de reproducción (1.4% de las hembras y 1.2% de los eventos). Las estrategias de apareamiento no parecen consistentes entre años para una misma hembra: para tres de las hembras analizadas se comprobó que tuvieron pollos con un único macho un año y con más de un macho diferente en otra temporada de reproducción diferente. Los apareamientos múltiples detectados en el caso de las hembras son mayoritarios, pues el 67% de las hembras ($n=49$) producen pollos con mas de un macho en una misma temporada de cría. La mayor parte de estos apareamientos ocurren de forma simultánea y dentro de la nidada (8 nidos con pollos de tres machos diferentes y 34 nidos con pollos de dos machos diferentes), mientras que 61 ocurren también de forma simultánea pero en diferentes polladas. Esto es debido a que la hembra pone algún huevo fertilizado por un macho diferente en otro nido mientras sigue cuidando de su primera puesta. Los restantes ocho casos de apareamiento múltiple suceden de forma secuencial, bien porque el primer nido es depredado (comprobado en tres ocasiones) o bien porque la hembra realiza una segunda puesta (comprobado en cinco ocasiones).

Por último, se han detectado 21 hembras (30%) que tienen pollos en dos o mas nidos en la misma temporada de reproducción. Siete hembras que tienen una pollada propia ponen además un huevo parásito en un nido ajeno. En cuatro polladas, la madre social no es la madre verdadera de ninguno de los pollos en el nido en el que es capturada, lo que sugiere que estaba cuidando una prole no relacionada genéticamente con ella.

3. Éxito reproductivo en machos y hembras asociado a las diferentes estrategias de apareamiento

Hasta ahora hemos confirmado la existencia de una gran variedad de estrategias de apareamiento en nuestras poblaciones de bisbita campestre. Existen individuos ciertamente monógamos, pero también hay machos polígamos y hembras poliándricas. Además, hemos confirmado la existencia de parasitismo de nidada (una hembra pone un huevo en nido ajeno) y eventos de cuasi-parasitismo, cuando una hembra fertilizada por un macho pone un huevo en el nido de otra hembra que también ha sido fertilizada por el mismo macho (produciendo pollos *FHS*). A continuación comprobamos si las distintas estrategias de apareamiento descritas en el apartado anterior producen diferencias en el éxito reproductivo individual, y si la estrategia de la pareja, además de la propia, influye en la eficacia biológica de los individuos.

3.1. Descripción de las variables

Para abordar la aproximación al éxito reproductor individual en función de la estrategia de apareamiento (tanto en machos como en hembras), se utilizaron los resultados de parentesco resultantes de la mejor configuración obtenida en el programa COLONY 2.0 (Wang 2004, Wang y Santure 2009), cuyo protocolo aparece detallado en el apartado anterior.

A diferencia del apartado anterior, en el que se han analizado las muestras procedentes exclusivamente de nidos o polladas completas, en este apartado se analizan también las polladas incompletas, por lo que los tamaños muestrales pueden variar ligeramente si se comparan ambos apartados. Esto es debido a que el apartado anterior se basa en estudiar las relaciones de parentesco entre pollos de un mismo nido (si todos los pollos de una misma pollada comparten los dos progenitores, sólo uno de ellos o ninguno) y extraer de dicha información el número

IV. ESTRATEGIAS DE APAREAMIENTO

de parejas genéticas de cada progenitor en cada nido, para lo cual es necesario trabajar sobre polladas completas. De otro modo se correría el riesgo de sesgar los resultados en contra de las estrategias de apareamiento minoritarias, pues en polladas incompletas es mas probable que pasen desapercibidas.

En este apartado, sin embargo, los datos de polladas incompletas también son informativos, pues ahora se trata de evaluar la cantidad total de huevos, pollos nacidos y pollos volados que cada macho y cada hembra obtienen a lo largo de una temporada de reproducción. Por lo tanto, los nidos muestreados parcialmente aportan información sobre el padre y la madre de cada pollo muestreado, independientemente de si se tienen todos los pollos producidos por un individuo o no.

A partir de los datos de parentesco de todos lo pollos analizados se calcularon, para cada padre y para cada madre, las siguientes variables en cada temporada de reproducción: a) *Número de huevos eclosionados (NHE)*, b) *Número de pollos que abandonan con éxito en nido (NP)*, c) *Tasa de vuelo (TV)*, medida como el numero de pollos que abandonan el nido respecto al número de huevos eclosionados, d) *Número de parejas genéticas*, medida como el número de individuos del sexo opuesto con los que un progenitor ha tenido, al menos, un descendiente, e) *Proporción de parejas monógamas (PPM)*, calculada como el número de parejas sexuales que a su vez son monógamas respecto al total de parejas de un individuo. Finalmente, la *estrategia reproductiva (ER)* de cada individuo en cada temporada de reproducción se clasificó como *monógama* o *polígama* en función del número de parejas sexuales (es decir, del número de individuos del sexo opuesto con el que tuvo al menos un descendiente en la población). Es importante hacer constar que esta clasificación debe considerarse como una aproximación a la realidad debido a la dificultad de investigar estas cuestiones en poblaciones naturales sometidas a altas tasas de depredación, donde una alta proporción de huevos y pollos son depredados sin que puedan ser muestreados y, por tanto, se desconocen las relaciones de parentesco para una fracción de los descendientes producidos en la población.

También existe una gran incertidumbre sobre el total de parejas con las que cada individuo se ha relacionado a nivel sexual durante la temporada de reproducción: no conocemos con exactitud el número de individuos diferentes con los que un individuo ha copulado ya que no todas las cópulas son exitosas y llegan a fertilizar el huevo. Ni siquiera conocemos todos los que llegaron a fertilizar algún huevo, ya que no todos los huevos fertilizados llegan a eclosionar. Por lo tanto, los resultados de este trabajo respecto al éxito reproductor individual y a los porcentajes de poliginia y poliandria observados deben ser considerados como valores mínimos de estos parámetros en nuestras poblaciones.

3.2. Análisis estadísticos

Para analizar los datos se utilizaron modelos mixtos no lineales, mediante el uso de la función '*glmer*' del paquete estadístico lme4 (Bates *et al.* 2014). Todos los análisis fueron realizados con el programa R (R Core Team 2013). Se construyó un modelo para cada una de las medidas de productividad citadas anteriormente (variable dependiente): *número de huevos eclosionados*, *número de pollos que abandonan el nido*, y *tasa de vuelo*. Los modelos se construyeron utilizando una distribución de tipo Poisson para las variables dependientes y una función de vínculo logarítmica. En todos los modelos se incluyó el *sexo*, la *estrategia reproductiva del progenitor* (monógamo o polígamo), la *proporción de parejas monógamas del progenitor* y las interacciones del *sexo* con estas dos variables como factores fijos. Además, el *año* y la *identidad del progenitor* se incluyeron en los modelos como factores aleatorios.

En el modelo para analizar *el número de pollos que abandonan el nido* se incluyó además la duración del periodo durante el cual el nido estuvo bajo observación (P_{obs}) como variable continua. Esta variable influye en la capacidad para detectar fracasos en los nidos (mayor probabilidad de detección de fracasos cuantos mas días esté un nido bajo observación) y, por lo tanto, en nuestras estimas de productividad (apartado II.3.3.6. *Estimación de la tasa de supervivencia diaria de los nidos*).

El modelo para analizar *la tasa de vuelo* se construyó utilizando la misma variable dependiente que en el modelo anterior (*número de pollos que abandonan el nido*), pero se incluyó el *número de huevos eclosionado* como variable *offset*, puesto que la primera variable depende en gran medida de la segunda, tal y como puede apreciarse tras un análisis de correlación (Pearson's $r = 0.56$, $df = 195$, $p < 0.0001$).

Los modelos se realizaron con el lote de progenitores resultante de las relaciones de parentesco establecidas con el programa COLONY. Este número incluye a los progenitores muestreados (capturados, de genotipo conocido) así como a los progenitores no muestreados y cuyos genotipos son inferidos por el programa. Todos los modelos se repitieron utilizando exclusivamente el lote de individuos capturados (con genotipo conocido) para confirmar la robustez de los resultados.

3.3. Resultados

Se muestrearon 32 nidos (107 pollos) en el año 2007, 18 nidos (72 pollos) en 2008, 26 nidos (99 pollos) en 2009, y 19 nidos (73 pollos) en 2010. Del total de pollos muestreados ($n = 351$) se han excluido 11 de los análisis por tener un genotipado incompleto (menos de 9 marcadores microsatélites).

Del total de padres y madres analizados, el 67% de las hembras resultaron ser poliándricas, habiendo tenido descendencia con una media de $2.4 (\pm 0.6)$ machos durante una misma temporada de reproducción. Los machos, por su parte, resultaron ser polígnicos en un 41% de los casos, habiendo tenido descendientes con una media de $2.8 (\pm 0.9)$ hembras por temporada de reproducción.

Los resultados del modelo para el *número de huevos eclosionados* (Tabla IV.6) indican que *NHE* difiere significativamente entre sexos, siendo las hembras mas productivas en promedio que los machos (media \pm sd para hembras: 3.58 ± 1.30 y para machos: 3.27 ± 1.90). La *estrategia reproductiva del progenitor (ER)* influye significativamente en *NHE*, teniendo los progenitores polígamos un mayor número de descendientes (4.16 ± 1.60) que los monógamos (2.58 ± 1.23). La interacción entre el *sexo* del progenitor y *ER* fue también significativa (Figura IV.1). Dicha interacción refleja que *NHE* fue significativamente

mayor en hembras monógamas que en machos monógamas, mientras que los machos polígamos fueron significativamente mas productivos que las hembras polígamas. En concreto, los machos polígamos produjeron 1.9 veces mas descendientes que los machos monógamas, mientras que las hembras polígamas tuvieron una prole sólo 1.2 veces mayor que las monógamas.

Respecto a la estrategia sexual de la pareja del progenitor, los resultados del modelo indican que la variable *proporción de parejas monógamas del progenitor (PPM)* no tuvo en si mismo un efecto importante sobre *NHE* (Tabla IV.6). Sin embargo, la interacción entre el sexo del progenitor y *PPM* resultó ser significativa. Los análisis realizados para cada sexo por separado indican que para las hembras el éxito reproductor individual, medido como *NHE*, es independiente del nivel de monogamia (*PPM*) de sus parejas ($\chi^2_1 = 1.54$, $p = 0.021$). Por el contrario, en el caso de los machos *NHE* aumenta a medida que aumenta *PPM* ($\chi^2_1 = 20.46$, $p < 0.0001$). Cuando repetimos el análisis considerando sólo los machos y hembras de genotipo conocido, los resultados del modelo son similares, aunque con ligeras variaciones en el nivel de significación (Tabla IV.6).

	Todos los progenitores		Progenitores de genotipo conocido	
	χ^2_1	p	χ^2_1	p
Sexo	5.68	0.017	6.95	0.008
Estrategia reproductiva del progenitor (ER)	4.40	0.03	2.39	0.12
Sexo x ER	7.79	0.003	8.0	0.005
Proporción de parejas monógamas (PPM)	0.81	0.37	0.17	0.68
Sexo x PPM	6.49	0.01	3.66	0.05

Tabla IV.6. Resultados de los modelos mixtos (el modelo incluye el año y la identidad del progenitor como factores aleatorios) para el número de huevos eclosionados (NHE) en función del sexo del progenitor, de su estrategia de apareamiento, y de la estrategia de la/s pareja/s del progenitor (proporción de parejas monógamas). En la tabla se muestra el valor del estadístico (Wald χ^2) y la probabilidad asociada para cada término del modelo. Se ofrecen también los resultados para el mismo modelo utilizando únicamente el lote de progenitores de genotipo conocido.

Respecto a la variable *número de pollos que abandonan el nido (NP)*, los resultados del modelo aparecen reflejados en la tabla IV.7, donde pueden apreciarse diferencias significativas entre sexos, con una mayor productividad obtenida por las hembras (2.38 ± 1.79 pollos) que por los machos (2.17 ± 2.05 pollos). No parecen existir, sin embargo, diferencias significativas en *NP* en función de la estrategia reproductiva (*ER*) del progenitor, pese a que los valores observados (datos brutos) para esta variable son en promedio mayores para los individuos polígamos (2.74 ± 2.00 pollos volados) que para los monógamos (1.74 ± 1.69 pollos volados). La interacción entre *ER* y *sexo* si fue estadísticamente significativa (Tabla IV.7 y Figura IV.2). En el caso de las hembras no existen diferencias aparentes entre *NP* en situaciones de monogamia ($\text{media} \pm \text{sd} = 2.16 \text{ pollos} \pm 1.84$) y de poligamia ($2.49 \text{ pollos} \pm 1.77$), mientras que para los machos la diferencia es clara: los machos polígamos consiguen mayor *NP* ($3.13 \text{ pollos} \pm 2.30$) que los monógamos ($1.52 \text{ pollos} \pm 1.57$).

Los machos polígamos tuvieron 3.6 veces más *NP* que los monógamos, mientras que en el caso de las hembras la diferencia fue 1.2 veces mayor *NP* en el caso de poligamia que en el caso de monogamia. La variable dependiente no mostró una relación significativa con la variable *PPM*, pero si con la interacción *PPM-sexo* del progenitor. Si observamos los resultados de los modelos para cada sexo podemos observar como para las hembras no hubo variación en *NP* según la proporción de monogamia en sus parejas ($\chi^2_1 = 0.29, p = 0.59$), mientras que en el caso de los machos *NP* fue mayor cuando *PPM* fue más alta ($\chi^2_1 = 16.28, p < 0.0001$). Los resultados obtenidos considerando únicamente los progenitores de genotipo conocido produjeron resultados similares, pese a pequeñas variaciones en los niveles de significación de los diferentes términos del modelo (Tabla IV.7).

Los resultados del modelo para la *tasa de vuelo (TV)* indican, en primer lugar, que el número de pollos que llegan a abandonar el nido respecto a la cantidad de huevos eclosionados para cada individuo es mayor en machos que en hembras, aunque no de forma significativa (Tabla IV.8), y que la estrategia reproductiva de la pareja (*PPM*)

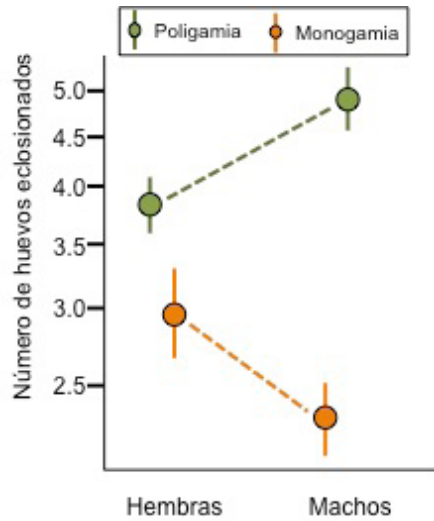


Figura IV.1. Variación en el número de huevos eclosionados (*NHE*) para machos y hembras de bisbita campestre en función de la estrategia de apareamiento (monogamia y poligamia). Se muestran las medias ajustadas (valores medios y el error estándar) del parámetro resultante del modelo completo. Interacción entre el *sexo* del progenitor y *la estrategia de apareamiento* significativa ($p = 0.003$, Tabla IV.6 en el texto)

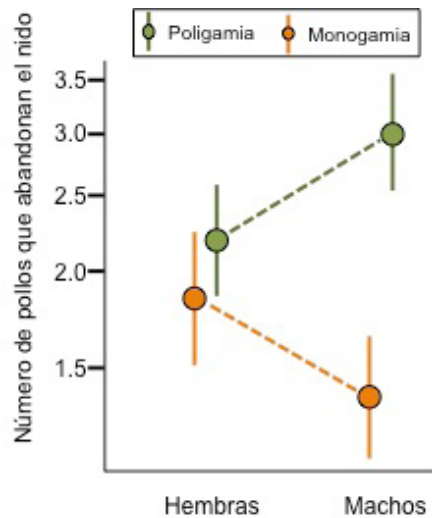


Figura IV.2. Variación en el número de pollos que llegar a abandonar el nido (*NP*) para machos y hembras de bisbita campestre en función de la estrategia de apareamiento (monogamia y poligamia). Se muestran las medias ajustadas (valores medios y el error estándar) del parámetro resultante del modelo completo. Interacción entre el *sexo* del progenitor y *la estrategia de apareamiento* significativa ($p = 0.018$, Tabla IV.7 en el texto)

IV. ESTRATEGIAS DE APAREAMIENTO

tampoco fue significativa en el modelo. La estrategia del progenitor si resultó significativa en el modelo, con una mayor tasa de vuelo en progenitores monógamos que en polígamos. Finalmente, la interacción del *sexo* del progenitor con *PPM* fue marginalmente significativa, mientras que la interacción entre el *sexo* del progenitor y *ER* resultó altamente significativa (Tabla IV.8). Los análisis para cada sexo por separado indican que no hay diferencias significativas en *TV* entre hembras monógamas y polígamas, mientras que las diferencias son significativas en el caso de los machos (Figura IV.3). En otras palabras, el coste de ser polígamo cuando analizamos la tasa de vuelo es mayor para machos que para hembras, puesto que la diferencia de pollos nacidos y los volados (es decir, pérdida de pollos) entre ambas estrategias es mucho mas acusada para los machos que para las hembras.

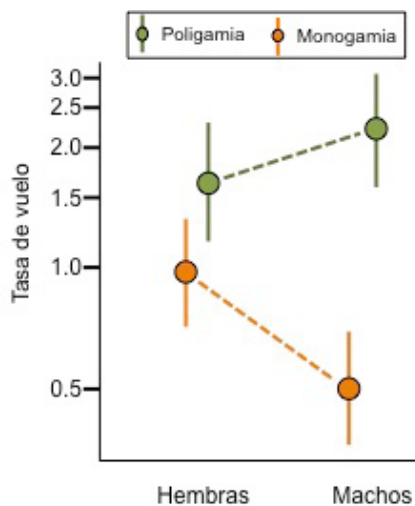


Figura IV.3. Variación en la tasa de vuelo (*TV*) para machos y hembras de bisbita campestre en función de la estrategia de apareamiento (monogamia y poligamia). Se muestran las medias ajustadas (valores medios y el error estándar) del parámetro resultante del modelo. Interacción entre el *sexo* del progenitor y la *estrategia de apareamiento* significativa ($p = 0.009$, Tabla IV.8 en el texto)

IV. ESTRATEGIAS DE APAREAMIENTO

	Todos los progenitores		Progenitores de genotipo conocido	
	χ^2_1	p	χ^2_1	p
<i>Sexo</i>	4.88	0.027	5.40	0.020
<i>Estrategia reproductiva del progenitor (ER)</i>	0.97	0.324	0.21	0.649
<i>Sexo x ER</i>	5.56	0.018	3.06	0.080
<i>Proporción de parejas monógamas (PPM)</i>	0.42	0.517	0.11	0.741
<i>Sexo x PPM</i>	5.94	0.015	4.56	0.032
<i>Tiempo bajo observación</i>	1.95	0.162	0.02	0.900

Tabla IV.7. Resultados de los modelos mixtos (el modelo incluye el *año* y la *identidad del progenitor* como factores aleatorios) para el número de pollos que abandonan el nido (*NP*) en función del sexo del progenitor, de su estrategia de apareamiento, y de la estrategia de la/s pareja/s del progenitor (proporción de parejas monógamas), y una vez controlado el tiempo que cada nido está bajo observación. En la tabla se muestra el valor del estadístico (Wald χ^2) y la probabilidad asociada para cada término del modelo. Se ofrecen también los resultados para el mismo modelo utilizando únicamente el lote de progenitores de genotipo conocido.

	Todos los progenitores		Progenitores de genotipo conocido	
	χ^2_1	p	χ^2_1	p
<i>Sexo</i>	2.70	0.100	2.91	0.088
<i>Estrategia reproductiva del progenitor (ER)</i>	3.89	0.048	3.95	0.046
<i>Sexo x ER</i>	6.76	0.009	13.7	0.000
<i>Proporción de parejas monógamas (PPM)</i>	0.76	0.382	0.48	0.490
<i>Sexo x PPM</i>	3.82	0.050	0.47	0.490
<i>Tiempo bajo observación</i>	19.55	0.000	2.39	0.122

Tabla IV.8. Resultados de los modelos mixtos (el modelo incluye el *año* y la *identidad del progenitor* como factores aleatorios) para la *tasa de vuelo* (pollos con éxito respecto a los nacidos) en función del sexo del progenitor, de su estrategia de apareamiento, y de la estrategia de la/s pareja/s del progenitor (proporción de parejas monógamas), y una vez controlado el tiempo que cada nido está bajo observación. En la tabla se muestra el valor del estadístico (Wald χ^2) y la probabilidad asociada para cada término del modelo. Se ofrecen también los resultados para el mismo modelo utilizando únicamente el lote de progenitores de genotipo conocido.

4. Discusión

En este estudio se describen por primera vez las estrategias de apareamiento exhibidas por el bisbita campestre en dos poblaciones mediterráneas, y los resultados proporcionan la primera evidencia genética de la coexistencia de diferentes estrategias (monogamia, poliginia, poliandria y poliginandria) dentro de una misma población y de una misma temporada de reproducción. Además de los clásicos análisis de paternidad centrados en las polladas, y que tratan de evaluar la cantidad de pollos fuera de la pareja existentes en cada nido, en este trabajo se ha incorporado una aproximación explícita a las estrategias de apareamiento desde el punto de vista de los intereses de cada sexo.

El primer resultado sorprendente es la considerable variación individual que existe en cuanto a las estrategias de apareamiento – fertilización–, y que da como resultado un sistema de apareamiento eminentemente promiscuo, basado en apareamientos múltiples tanto en machos como en hembras, pese al carácter monógamo descrito para la especie (Del Hoyo et al. 2004). Hay que hacer constar aquí que en este trabajo se entiende por promiscuidad la ausencia de vínculos de pareja ‘estables’ según los criterios clásicos, y que en su lugar machos y hembras tienen o pueden tener varias parejas sexuales, ya sea de forma secuencial o simultánea, a lo largo de la temporada de reproducción.

Únicamente un 39% del total de las polladas estudiadas están compuestas íntegramente por hermanos de padre y madre, lo que sugiere que la monogamia no es la estrategia mas extendida en el bisbita campestre, al menos en nuestras poblaciones de estudio, y que una apreciable fracción de la población tiene mas de una pareja sexual a la vez. Teniendo en cuenta que las frecuencia de cada estrategia de apareamiento en la población están calculadas en base a huevos ya eclosionados (es decir, fertilizaciones que han tenido éxito), la promiscuidad en cuanto a la actividad copulatoria es posible que esté aun mas extendida de lo observado. Por lo tanto, los resultados difieren

en gran medida del conocimiento previo que se tiene sobre la estrategia de apareamiento en la especie y que está basado en observaciones comportamentales de individuos en poblaciones del centro y norte de Europa (Del Hoyo et al. 2004), lo que acentúa la necesidad de revisar la estructura social de la especie.

La evolución de los sistemas de apareamiento en organismos con reproducción sexual es un tema apasionante de estudio y que ha generado una extensa bibliografía (véase, por ejemplo, Sanz 2002). Se ha propuesto una amplia variedad de factores para explicar los apareamientos múltiples, en especial por parte de las hembras, que incluyen beneficios tanto directos como indirectos para el progenitor (Awise *et al.* 2011). En nuestro caso, la existencia de tipos de apareamiento diferentes en la misma población implica una gran plasticidad en el comportamiento copulatorio y/o en las decisiones de apareamiento, posiblemente en relación a factores ecológicos próximos (Gowaty 2013). Algunas de las características de las poblaciones estudiadas que se comentan a continuación podrían estar implicadas en la toma de decisiones de los individuos acerca de con quién aparearse.

En primer lugar, llama la atención la evidente ausencia de cuidado parental por parte de los machos en nuestras poblaciones, hecho sorprendente para una especie de paseriforme descrita como monógama. A pesar de que en estudios previos realizados en los años 70 y 80 en otras poblaciones europeas de la especie se describe cierto grado de cuidado parental por parte de los machos (observaciones de machos entrando al nido tanto durante la incubación como durante la alimentación de los pollos), nuestros datos arrojan ciertas dudas sobre la generalidad de este comportamiento. La captura de machos atendiendo a los nidos es anecdótica en nuestras poblaciones, y en ninguno de los escasos eventos detectados el macho capturado en el nido resultó ser el padre de los pollos. Este hecho enfatiza el comportamiento promiscuo por parte de las hembras, que seguramente copulan con un mayor número de machos a lo largo de la reproducción de lo observado mediante el análisis de las fertilizaciones que han resultado exitosas (pollos nacidos). Esto podría explicar la presencia de algunos machos, que podrían haber copulado previamente con esa hembra, visitando los nidos durante la fase de pollos.

Dado que el cuidado de la prole (principalmente su alimentación) es una tarea costosa para los machos y que además limita sus oportunidades de aparearse con otras hembras (Westneat *et al.* 1990, Ketterson y Nolan 1994, Westneat y Sargent 1996), los machos polígamos normalmente proporcionan menor cuidado parental que los machos monógamos (véase por ejemplo, Clutton Brock 1991, Møller 2000). En el caso del bisbita no sabemos hasta qué punto una mayor inversión en cuidado parental limita efectivamente las oportunidades de apareamiento múltiple o si, por el contrario, el cuidado parental hacia los pollos se ve reducido en situaciones de apareamiento múltiple. Mas aún, desconocemos si en el caso del bisbita campestre se produce algún tipo de ajuste en el cuidado parental del macho en función de la promiscuidad de la hembra o *viceversa*. Se sabe que la inversión en cuidado parental opera en detrimento de otras tareas reproductivas, por lo que es lógico pensar que los machos podrían estar ajustando su inversión en cuidado parental en función de su nivel de certidumbre sobre la paternidad del nido (Griffin *et al.* 2013). Por lo tanto, ante un comportamiento promiscuo por parte de las hembras en la población, la selección a favor de machos con reducido cuidado parental y mayor promiscuidad puede haber ayudado a extender este comportamiento en nuestras poblaciones.

Por otro lado, es evidente que en esta especie la hembra tiene la capacidad para incubar sola y alimentar a los pollos sin la ayuda del macho, algo que es posible en situaciones de alta abundancia de recursos y que explicaría la ausencia generalizada de cuidado parental por parte del macho, facilitando la poliginia (Sanz 2002).

En segundo lugar, las tasas de depredación de nidos registradas en el bisbita campestre en el centro de España son las más elevadas descritas para la especie y unas de las más altas en passeriformes, suponiendo el 85% de los fracasos durante la incubación y un 89% durante la fase de pollos (apartado III.3. *Fracasos durante la reproducción y depredación de nidos*). La presión ejercida por los depredadores en estas zonas es probable que afecte a las decisiones individuales sobre los apareamientos. Por ejemplo, la depredación es un factor que está regulando constantemente el número de hembras disponibles para la reproducción a lo largo de todo el periodo de cría (Calero-Riestra *et al.*

2013), pues determina en gran medida el momento en que se producen los eventos de nidificación en la población. Al igual que se ha visto en otras especies, la depredación influye en la probabilidad de realizar dobles puestas y puestas de reposición (Shimidt y Whelan 1999), y puede influir, por lo tanto, sobre la sincronía en la reproducción y sobre la cantidad de hembras fértiles en cada momento (McRae 1997). Ambos factores, sincronía y densidad de hembras disponibles, están íntimamente relacionados con la probabilidad de que se produzcan apareamientos múltiples, tal y como se ha constatado en diversos estudios realizados con aves (Canal *et al.* 2012, Pasinelli 2013).

La depredación del nido también puede estar reflejando la baja calidad de la pareja social, o al menos que las hembras lo perciban como tal, en cuyo caso las hembras podrían tratar de incrementar sus esfuerzos de apareamiento fuera de la pareja después de un fracaso del primer nido (Gissing *et al.* 1998). Mas aún, si la percepción del riesgo de depredación es alta, para las hembras sería ventajoso tener siempre cerca nuevas parejas de cópula que pudieran fertilizar sus huevos cuanto antes tras un evento de depredación. Las cópulas frecuentes con machos cercanos se han descrito en otras especies de aves como una estrategia por parte de las hembras para aumentar vínculos con los machos e incrementar la probabilidad de fertilizar los huevos (Birkhead *et al.* 1987, Møller y Birkhead 1992). Este comportamiento encaja a la perfección con lo observado en este trabajo en cuanto a la existencia de huevos puestos por hembras en nidos no relacionados (parasitismo de pollada) cuando ya tenían nido propio. Si las cópulas frecuentes se traducen en fertilizaciones frecuentes, la hembra puede necesitar poner huevos en cualquier momento y, en determinadas ocasiones, la mejor opción para la supervivencia de ese huevo será la búsqueda de un nido fenológicamente compatible en lugar del propio.

Otra posible explicación a este hecho es que una alta tasa de depredación de nidos percibida por la hembra durante la incubación se traduzca en un intento de maximizar su éxito reproductor con la puesta de huevos adicionales de forma parásita (Hamilton y Orians 1965), dividiendo la prole entre varios nidos. El parasitismo de nidada

entre individuos de la misma especie puede, de esta manera, diluir el riesgo de depredación (Payne 1977), y ha sido propuesta como una estrategia útil en este sentido en poblaciones de aves sometidas a altas tasas de depredación (Eadle y Lumsden 1985). Hasta la fecha, sin embargo, los datos empíricos que apoyan esta interesante idea son escasos (véase Lyon y Eadie 2008 para una revisión). Aunque este trabajo no está específicamente diseñado para abordar estas cuestiones, nuestros resultados sugieren una estrecha relación entre la depredación de nidos y las estrategias de apareamiento, al menos en este tipo de ambientes estacionales.

Parasitismo y cuasi-parasitismo

Los casos de cuasi-parasitismo, cuando una hembra pone un huevo en un nido de otra hembra que ha sido fertilizada por el mismo macho, son relativamente raros en las aves. En una revisión reciente Griffith *et al.* (2004) encontraron este comportamiento sólo en 12 de las 130 especies revisadas, lo que puede atribuirse simplemente a la casualidad en poblaciones con una alta tasa de paternidad fuera de la pareja y de parasitismo de nidada (Alves y Bryan 1998), como es el caso de determinadas especies de aves coloniales. En estos casos es probable que, por azar, una hembra fertilizada por un macho ajeno a la pareja ponga un huevo en un nido cercano que también ha sido fertilizado por el mismo macho. Sin embargo, estos autores admiten que el cuasi-parasitismo puede también ser adaptativo bajo determinadas circunstancias (escasa disponibilidad de machos en la población, por ejemplo) puesto que puede proporcionar beneficios tanto genéticos como demográficos a las hembras parásitas y, en ocasiones también al macho (Griffith *et al.* 2004). Por el contrario, el parasitismo de nidada es relativamente común en aves (Arnold y Owens 2002), especialmente en especies precociales y coloniales (Yom Tov 2001). Dentro del género *Anthus*, tanto el cuasi-parasitismo como el parasitismo han sido registrados sólo en el bisbita ribereño alpino (*Anthus spinoletta*) (Reyer *et al.* 1997). En base a la baja frecuencia de casos registrados de ambos comportamientos en dicha especie (0.5% de los pollos de 1.9% de los nidos en ambos casos), y al comportamiento de las hembras durante la reproducción –que

buscan alimentos regularmente en territorios solapados y comparten lugares de alimentación– los autores argumentaron que ambos tipos de parasitismo pueden ser considerados como eventos azarosos en el bisbita ribereño alpino. Las visitas regulares a los territorios vecinos y los lugares comunes de alimentación aumentan la probabilidad de fertilizaciones fuera de la pareja con machos vecinos y, por tanto, la probabilidad de poner un huevo en una puesta que también haya sido fertilizada por el mismo macho (Reyer et al. 1997). Si bien es cierto que los casos de cuasi-parasitismo en el bisbita campestre entrarían dentro de lo esperado teóricamente por azar en una situación de alta tasa de paternidad fuera de la pareja y escaso número de nidos vecinos (Griffit et al. 2004), no podemos descartar otras interpretaciones, como la existencia de algún tipo de cooperación entre hembras. Hay que hacer constar aquí que nuestras estimas son conservativas debido a que no muestreamos huevos no eclosionados ni pollos muertos antes del muestreo. Las estimas muy probablemente varíen si, por ejemplo, hay un éxito diferencial en la tasa de eclosión de los huevos parásitos y los huevos de la puesta parasitada, simplemente por desajustes en el desarrollo del embrión. O si los nidos parasitados sufren mayor probabilidad de ser depredados que los nidos no parasitados debido a un aumento de la actividad del nido (mayor frecuencia de visitas al nido por parte de las hembras, agresiones entre hembras, etc.) y, por tanto, a una mayor probabilidad de ser detectado por un depredador.

Las altas tasas de ambos comportamientos en el bisbita campestre, junto con la existencia de algunas polladas donde la hembra capturada que atendía al nido no estaba relacionada genéticamente con ninguno de los pollos, permite pensar que no son casos accidentales en nuestras poblaciones. Mas bien plantean la posibilidad de algún tipo de cooperación entre individuos durante la reproducción. En los sistemas clásicos de cría cooperativa, por ejemplo, las crías reciben alimento por parte de ayudantes (*'helpers'*) además del alimento recibido de sus madres (véase por ejemplo Russel et al. 2007). Aquí no podemos confirmar esta posibilidad, pero si plantearla, puesto que al planificar las capturas no contemplamos la opción de que pudiera haber varias hembras atendiendo un mismo nido, por lo que una vez capturada una hembra no se volvió a ensayar la captura en dicho nido.

Éxito reproductor asociado a las diferentes estrategias de apareamiento

Para entender apropiadamente el funcionamiento de las diferentes estrategias reproductivas respecto de las relaciones sexuales (fertilizaciones) entre los miembros de una población se requiere un buen conocimiento de los beneficios directos e indirectos que comporta cada estrategia y de los costes asociados para cada individuo. Los análisis genéticos y el trabajo de campo llevado a cabo durante esta tesis permite una buena evaluación de los beneficios directos tanto para los machos como para las hembras de cada una de las estrategias observadas (véase Tabla IV.9).

El principal resultado de este trabajo es que tanto los machos como las hembras que siguen una estrategia polígama son capaces de obtener un mayor número de huevos eclosionados y de pollos volados que los individuos que muestran una estrategia monógama. No obstante, los individuos polígamos sufren una mayor tasa de pérdidas durante la fase de estancia de pollos en el nido, lo que hace que la tasa de vuelo (proporción de pollos con éxito respecto a los nacidos) sea similar entre individuos que optan por cualquier de las dos estrategias, tanto en machos como en hembras. Este resultado se ajusta perfectamente a las predicciones existentes sobre los beneficios de la poligamia en el caso de los machos y de la poliandria en el caso de las hembras.

El segundo resultado destacable del trabajo es que en el caso de los machos no sólo es importante la estrategia seguida por el progenitor a la hora de obtener mayor o menor éxito durante la reproducción, sino que el éxito depende también, en cierta medida, de la estrategia seguida por las parejas sexuales. De esta forma, la estrategia de las hembras condiciona en gran medida el éxito final de los machos, mientras que el éxito de las hembras no depende de la estrategia seguida por los machos que fertilizan sus huevos. Queda claro que el supuesto básico de que los machos tienen mucho que ganar al copular con múltiples parejas (Bateman 1948, Trivers 1972) sólo se cumple si las hembras no hacen lo mismo. El éxito reproductivo de los machos se ve muy reducido cuando se aparean con hembras poliándricas respecto a cuando las hembras son monógamas. Aun así, tanto machos

como hembras obtienen beneficios directos claros por el hecho de ser promiscuos, produciendo más pollos por temporada que en el caso de los individuos monógamos (Tabla IV.9).

Si comparamos estos resultados con los obtenidos de un estudio basado en el enfoque tradicional donde se asume monogamia social (apartado III.1. *Descripción de los parámetros reproductivos*), lo primero que se puede apreciar es que la cantidad de machos y hembras que se reproducen en la población es menor de que parece. Las 82 polladas completas analizadas (apartado IV.2. *Descripción de las estrategias de apareamiento genético*) y que se corresponderían con 82 machos y otras tantas hembras reproductoras bajo un enfoque tradicional, fueron realmente producidas por 75 machos y 73 hembras, lo que indica la existencia de apareamientos múltiples y puestas de reposición (una misma hembra es la madre de varios nidos). Por lo tanto, el número de nidos no puede ser asumido como un indicador de la cantidad de parejas reproductoras en la población. Además, el promedio de descendientes por individuo asumiendo monogamia en nuestras poblaciones, es decir, considerando que los pollos encontrados en cada nido corresponderían exclusivamente a un macho y una hembra, es de 3.92 pollos nacidos y 2.12 pollos volados. Estos valores calculados sobre los mismos nidos una vez analizado el parentesco real son menores en cuanto al número de pollos nacidos (3.58 pollos por hembra y 3.27 pollos/macho, Tabla IV.9) y ligeramente mayores respecto al número de pollos volados (2.38 pollos por hembra y 2.17 pollos por macho).

Parámetro	Monogamia		Poligamia	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras
<i>Huevos eclosionados</i>	2.34 (±1.17)	3.03 (±1.25)	4.62 (±1.95)	3.85 (±1.24)
<i>Pollos con éxito</i>	1.52 (±1.57)	2.16 (±1.84)	3.11 (±2.30)	2.49 (±1.77)
<i>Tasa de vuelo</i>	0.56 (±0.50)	0.61 (±0.49)	0.50 (±0.50)	0.55 (±0.50)

Tabla IV.9. Estadísticos descriptivos (media y desviación) de comparación para los parámetros reproductivos observados en machos y hembras en función de su estrategia de apareamiento. *Tasa de vuelo* calculada como nº de huevos eclosionados/nº de pollos con éxito.

IV. ESTRATEGIAS DE APAREAMIENTO

La anterior comparación ofrece implicaciones importantes desde el punto de vista evolutivo y para entender cómo se mantienen diferentes estrategias en la misma población. La variación entre años de las condiciones locales lo permitirían, si en determinados años algunas estrategias son mas ventajosas que otras y si esta ventaja varía con los años, de forma que ambas presenten ventajas en determinados años.

Por otro lado el cuidado parental no parece influir en las estrategias de apareamiento, puesto que el éxito de las hembras no parece depender de lo que hagan sus parejas. De ser importante, los machos monógamos podrían decidir realizar cuidado parental, algo que no ha sido detectado en este estudio

Independientemente de la estrategia seguida por los adultos, los individuos logran sacar adelante la mitad aproximadamente de la prole por el efecto de la depredación. Por lo tanto, en situaciones como ésta donde la tasa de depredación es alta parece lógico que evolucionen estrategias encaminadas a maximizar la cantidad de huevos producidos y, por tanto, pollos nacidos y pollos volados. Además, los nidos de individuos promiscuos no son mas depredados que los nidos de individuos monógamos (similar tasa de vuelo) tal y como se ha propuesto a nivel teórico y observado en determinadas especies, por lo que el hecho de adoptar una estrategia promíscua no parece acarrear costes en este sentido en nuestras poblaciones. Por todo ello, y considerando que además de los beneficios directos pueden existir también beneficios indirectos la rentabilidad aportada por la promiscuidad parece suficiente para explicar su existencia y permanencia en la población. Tengamos en cuenta que hay mucha depredación de nidos y el tiempo para reproducirse es limitado (ausencia de dobles puestas)

Habitualmente existe poca variación intraespecífica en los sistemas reproductivos, algo típico en las aves, con una forma siendo asumida como la única en una misma población. No obstante, las aproximaciones genéticas pueden proporcionar mayor variabilidad a este resultado (Griffith et al. 2002, Westneat y Stewart 2003). Mientras que el beneficio de los machos es claro, el de las hembras poliandricas no

tanto (Jenions y Petrie 2000, Arnqvist y Kirkpatrick 2005, Slatyer et al. 2012). Recientemente se han descubierto beneficios no aparentes, no directos, como los beneficios genéticos, que ayudan a explicar los apareamientos múltiples en las hembras (Jenions y Petrie 2000).

Sin embargo, algunas especies de aves sí muestran en una misma población diferentes estrategias en cuanto a los apareamientos sexuales, como el calamón *Porphyrio porphyrio* (Jamieson et al. 1994), el acentor común *Prunella modularis* (Davies y Houston 1986, Santos y Nakagawa 2013) o el pico tridáctilo *Picoides tridactylus* (Li et al. 2009).

Será muy interesante seguir investigando en busca de beneficios indirectos (genéticos) de cada sistema de apareamiento.

V. CONCLUSIONES

A lo largo de los apartados anteriores se han expuesto y discutido los resultados obtenidos en el estudio sobre la ecología del bisbita campestre durante el periodo reproductor, incluyendo una aproximación descriptiva a los parámetros reproductivos en las poblaciones estudiadas, una valoración de cómo los enemigos naturales (depredadores y parásitos) pueden afectar a la especie, y un examen detallado del sistema de apareamiento y sus efectos sobre el éxito reproductor de los individuos desde una perspectiva genética. No se trata por tanto aquí de repetir estos resultados, sino de realizar una síntesis de ellos, glosando las principales conclusiones obtenidas.

La combinación de trabajo de campo y laboratorio me ha permitido obtener una visión bastante completa sobre algunos de los principales factores ecológicos que regulan la reproducción del bisbita campestre en latitudes mediterráneas, constituyendo quizá el estudio mas completo realizado sobre la reproducción de la especie hasta al fecha. Sin embargo, muchas de las cuestiones que se pretendía investigar son tratadas sólo de forma superficial en este estudio, y otras quedan claramente sin resolver. Algunas de estas cuestiones podrán abordarse en profundidad en un futuro próximo mediante el análisis de datos obtenidos durante la tesis y que no han sido utilizados aquí sobre la selección del hábitat de nidificación, alimentación, análisis espaciales de las relaciones entre individuos, y observaciones focales de comportamiento realizadas sobre machos y hembras. Estos datos aportarán información adicional relevante sobre la importancia de la estacionalidad de los recursos, la competencia y la importancia de la depredación para la reproducción de la especie en nuestras latitudes. Por otro lado, queda aún mucha información interesante por extraer de los datos genéticos y que nos permitirá investigar en detalle los posible beneficios indirectos que los distintos sistemas de apareamiento proporcionan a machos, hembras y prole. Con todo ello quizá consigamos aportar un poco mas de luz para comprender la manera en que se reproducen este tipo de aves en los páramos y el funcionamiento general del ecosistema en nuestras latitudes, conocimiento que puede ser muy necesario para la conservación de

V. CONCLUSIONES

esta y otras especies en un futuro próximo. Además, contribuiría de forma secundaria a ampliar el conocimiento existente sobre las estrategias vitales de las aves desde una perspectiva evolutiva.

Las principales conclusiones de esta tesis pueden resumirse en tres grandes puntos:

1. La reproducción del bisbita campestre en los páramos ibéricos parece estar restringida por el efecto combinado de la depredación y la estacionalidad de los recursos. En especies migradoras como el bisbita campestre existe una acotación temporal de la temporada reproductora. En función de lo observado en este estudio la disponibilidad de alimento también parece condicionar la reproducción hacia el final de la temporada, lo que supone para los adultos un periodo de tiempo muy limitado para la reproducción. La duración del periodo reproductor hace prácticamente inviable la existencia de dobles puestas y limita en gran medida el éxito de las puestas de sustitución a las que se produzcan al principio de la temporada. Todo esto condiciona las oportunidades de reproducirse con éxito y el número de descendientes que se pueden producir en una temporada de reproducción.

De forma paralela, la depredación de nidos en los páramos ibéricos es la principal causa de fracasos en la reproducción de la especie con elevadas tasas de depredación de huevos y pollos. Mientras la depredación de huevos se mantienen constante durante toda la reproducción, la depredación de pollos es mayor en las puestas más tempranas. Este hecho sugiere, por una parte, que los depredadores de huevos y pollos con distintos y, por otra, que en ambientes con escasa abundancia de alimento para los depredadores los nidos tempranos están sometidas a una mayor presión de depredación que los tardías debido a que según avanza la estación aumenta la disponibilidad de presas (pollos nacidos). Esta puede ser la razón de que el bisbita campestre muestre un patrón temporal en la productividad cuyo óptimo se sitúa hacia la mitad del periodo reproductor en lugar de al principio, como suele suceder en la mayoría de aves similares. Cuantas

mas ‘presas’ haya disponibles en la población para los depredadores de pollos menor será la presión de depredación por nido, relación que se estabiliza hacia la mitad del periodo reproductor y que podría explicar el patrón observado.

2. Dentro del contexto Europeo, los parásitos en general y en concreto los parásitos sanguíneos afectan a las aves –reproducción, condición, eficacia biológica– en mayor medida conforme nos desplazamos hacia el sur (Møller *et al.* 2013), por lo que sus efectos sobre el bisbita campestre en ambientes mediterráneos podrían ser importantes. Los resultados obtenidos en esta tesis, con una alta prevalencia observada tanto en adultos como en pollos, permiten especular sobre el papel que ejercen los parásitos sanguíneos en la reproducción de la especie en nuestras poblaciones. Los resultados son coherentes con la hipótesis de que el sistema inmune poco desarrollado y sin contacto previo con el parásito hace que los pollos sean altamente susceptibles a desarrollar infecciones, y los efectos detectados sobre el crecimiento de los pollos hacen pensar que el compromiso entre la inversión en inmunidad y la inversión en crecimiento somático puede ser particularmente importante en poblaciones como las estudiadas en esta tesis, pues entra en conflicto con la presión selectiva que supone la elevada depredación sobre la tasa de crecimiento de los pollos. Así, los pollos de bisbita campestre priorizan el crecimiento sobre la función inmune, quizá apremiados por la necesidad de abandonar el nido cuanto antes para reducir la probabilidad de ser depredados, pese a que ello suponga un mayor perjuicio en forma de parasitación especialmente patente en el caso del sexo que ha de crecer mas rápido (machos). El efecto de los parásitos también se aprecia en los adultos, en especial sobre la condición corporal de las hembras que parecen verse afectadas en mayor medida que los machos, probablemente por la diferencia sexual en los compromisos entre el sistema inmune y la inversión en reproducción (mayor en las hembras de esta especie).

3. Se ha descrito por primera vez el sistema de apareamiento del bisbita campestre, y los resultados ofrecen evidencias genéticas indiscutibles de la existencia de monogamia, poliginia y poliandria en una misma población y durante una misma temporada de reproducción. Además, se han observado comportamientos de parasitismo de nidada y cuasi-parasitismo. Este sistema de apareamiento eminentemente promiscuo contrasta con el sistema social monógamo descrito con anterioridad para la especie en base a observaciones comportamentales de individuos en poblaciones del centro y norte de Europa (y sin garantías de haberse realizado sobre ejemplares marcados individualmente), lo que acentúa la necesidad de revisar la estructura social de la especie.

La alta promiscuidad encontrada en el bisbita campestre podría estar íntimamente relacionada con un factor ecológico de gran importancia para la reproducción en las poblaciones estudiadas, como es la alta tasa de depredación de nidos. Sin descartar otras explicaciones, los resultados obtenidos respecto a los apareamientos promiscuos concuerdan con un sistema donde la depredación condiciona la cantidad disponible de hembras fértiles en cada momento de la reproducción, la posibilidad y la necesidad de realizar puestas de sustitución tras la depredación del nido, y supone una fuerte presión de selección a favor de producir un elevado número de descendientes y distribuirlos, a ser posible, en diferentes polladas, diluyendo así el riesgo de depredación. En cualquier caso, el tema permanece abierto a futuras investigaciones, ya que nadie ha abordado en detalle la relación entre la depredación y los sistemas de apareamiento.

En este contexto, el conflicto sexual parece resolverse de forma satisfactoria para ambos sexos en el bisbita campestre, con beneficios directos en forma de número de descendientes respecto a una estrategia puramente monógama, lo que permitiría explicar desde un punto de vista evolutivo cómo pueden coexistir de forma aparentemente estable las diferentes estrategias en una misma población. El análisis futuro de los beneficios indirectos (genéticos) que machos y hembras pueden obtener de las diferentes estrategias de apareamiento aportarán nuevos indicios sobre los factores que las determinan y sobre las implicaciones evolutivas para las estrategias vitales en aves.

BIBLIOGRAFÍA

- Agnew, P., Koella, J.C. y Michalakakis, Y. 2000.** Host life history responses to parasitism. *Microbes and Infection* 2: 891–896.
- Alström, P. y Mild, K. 2003.** Pipits and Wagtails of Europe, Asia and North America: identification and systematics. Christopher Helm/A&C Black & Princeton University Press, London.
- Alves, M.A.S. y Bryant, D.M. 1998.** Brood parasitism in the sand martin, *Riparia riparia*: evidence for two parasitic strategies in a colonial passerine. *Animal Behaviour* 56: 1323–1331.
- Andersson, M. 1994.** Sexual Selection in Animals. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Arnold, K.E. y Owens, I.P.F. 2002.** Extra-pair paternity and egg dumping in birds: life history, parental care and the risk of retaliation. *Proceedings of the Royal Society of London B* 269:1263–1269.
- Arnqvist, G. y Nilsson, T. 2000.** The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Animal Behaviour* 60:145–164.
- Arnqvist, G. y Kirkpatrick, M. 2007.** The evolution of infidelity in socially monogamous passerines revisited: a reply to Griffith. *American Naturalist* 169:282–283.
- Ashmole, N. 1961.** The biology of certain terns. PhD dissertation. Oxford University, Oxford.
- Avise, J.C., Tatarenkov, A. y Liu, J.-X. 2011.** Multiple mating and clutch size in invertebrate brooders versus pregnant vertebrates. *PNAS* 108: 11512–11517.
- Bates, D., Maechler, M. y Bolker, B. 2013.** lme4: Linear-mixed Effects Models Using Eigen and S4. <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>.
- Bates, D.M., Mächler, M., Bolker, B.M. y Walker, S.C. 2014.** Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. <http://arxiv.org/abs/1406.5823>.
- Bateman, A.J. 1948.** Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity* 2: 349–368.
- Beaudoin, R., Applegate, J., Davis, D. y McLean, R. 1971.** A model for the ecology of avian malaria. *Journal of Wildlife Diseases* 7:5–13.
- Bensch, S., Hellgren, O. y Pérez-Tris, J. 2009.** MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. *Molecular Ecology Resources* 9:1353–1358.
- Bijlsma, R.G. 1978.** Het voorkomen van de Duinpieper *Anthus campestris* op de Zuidwest-Veluwe, Nederland, deel 1: broedtijd. *Limosa* 51:107–121.
- Bijlsma, R.G. 1990.** Habitat, territoriumgrootte en broedsucces van Duinpiepers *Anthus campestris*. *Limosa* 63:80–81.

- BirdLife International. 2010.** Species factsheet: *Anthus campestris*. [http: www.birdlife.org](http://www.birdlife.org).
- Birkhead, T.R., Atkin, L. y Møller, A.P. 1987.** Copulation behaviour of birds. *Behaviour*, 101, 101–138.
- Birkhead, T.R. y Møller, A.P. 1992.** *Sperm Competition in Birds*. London: Academic Press.
- Birkhead, T.R. y Møller, A.P. 1995.** Extra-pair copulation and extra-pair paternity in birds. *Animal Behaviour* 49: 843–848.
- Birkhead, T.R. y Møller, A.P. 1996.** Monogamy and sperm competition in birds. Páginas 323–343 *en* Black, J.M. (ed) *Partnerships in birds: The study of monogamy*. Oxford: Oxford University Press.
- Black, J.M. 1996.** *Partnerships in birds: the study of monogamy*. Oxford University Press, Oxford.
- Blackmore, C.J. y Heinsohn, R. 2008.** Variable mating strategies and incest avoidance in cooperatively breeding grey-crowned babblers. *Animal Behaviour* 75,63–70.
- Blondel, J., Aronson, J., Bodiou, J.Y. y Boeuf, G. 2010.** *The Mediterranean region: biological diversity in space and time*. Oxford University Press, Oxford.
- Borgmann, K.L., Conway, C.J. y Morrison, M.L., 2013.** Breeding phenology of birds: mechanisms underlying seasonal declines in the risk of nest predation. *PLoS One* 8: e65909.
- Bosque, C. y Bosque, M.T. 1995.** Nest predation as a selective factor in the evolution of developmental rates in altricial birds. *American Naturalist* 145:234–260.
- Brown, C.R., Bomberger Brown, M. y Bruce, R. 1995.** Ectoparasites reduce long-term survival of their avian host. *Proceedings: Biological Sciences* 262(1365): 313–319.
- Burley, N.T. y Johnson, K. 2002.** The evolution of avian parental care. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 357: 241–250.
- Calero-Riestra, M., García, J.T., Herranz, J. y Suárez, F. 2013.** Breeding output and nest predation patterns in steppe-associated Mediterranean birds: the case of the Tawny Pipit *Anthus campestris*. *Journal of Ornithology* 154: 289–298.
- Canal, D., Jovani, R. y Potti, J. 2012.** Male decisions or female accessibility? Spatiotemporal patterns of extra pair paternity in a songbird. *Behavioral Ecology* 23:1146–1153.
- Carrascal, L.M. y Palomino, D. 2008.** *Las aves comunes reproductoras en España. Población en 2004–2006*. SEO/Birdlife, Madrid.

- Cheng, Y-R. y Martin, T.E. 2012.** Nest predation risk and growth strategies of passerine species: grow fast or develop traits to escape risk? *American Naturalist* 180:285–295.
- Clutton-Brock, T.H. 1991.** The evolution of parental care. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Cosgrove, C.L., Knowles, S.C.L., Day, K.P. y Sheldon, B.C. 2006.** No evidence for avian malaria infection during the nestling phase in a passerine bird. *Journal of Parasitology* 92:1302–1304.
- Cosgrove, C.L., Wood, M.J., Day, K.P. y Sheldon, B.C. 2008.** Seasonal variation in *Plasmodium* prevalence in a population of blue tits *Cyanistes caeruleus*. *Journal of Animal Ecology* 77:540–548.
- Cramp, S. 1998.** The Birds of the Western Palearctic, vol 5. Oxford University Press, Oxford.
- Crawford, N.G., Peters, M.B., Hagen, C., Glenn, T.C., Davis, S.K. y Somers, C.M. 2009.** Polymorphic microsatellite loci from Sprague's pipit (*Anthus spragueii*), a grassland endemic passerine bird. *Molecular Ecology Resources* 9:315–317.
- Crick, H., Gibbons, D., y Magrath, R. 1993.** Seasonal changes in clutch size in British birds. *J Anim Ecol* 62:263–273.
- Crick, H.Q.P. 2004.** The impact of climate change on birds. *Ibis* 146:48–56.
- Darwin, C. 1859.** On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life. John Murray. London.
- Davies, N.B. 1985.** Cooperation and conflict among dunnocks, *Prunella modularis*, in a variable mating system. *Animal Behaviour* 33:628–648.
- Davies, N.B. y Houston, A.I. 1986.** Reproductive success of dunnocks, *Prunella modularis*, in a variable mating system. II. Conflicts of interest among breeding adults. *J Animal Ecology* 139–154.
- Dawson, D.A., Horsburgh, G.J., Küpper, C. et al. 2010.** New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high cross-species utility – as demonstrated for birds. *Molecular Ecology Resources*, 10: 475–494.
- De Rosario-Martínez, H. 2013.** phia: Post-hoc interaction analysis. R Package Version 01-3.
- Del Hoyo, J., Elliott, A. y Christie, D. 2004.** Handbook of the birds of the world (volume 9): Cotingas to Pipits and Wagtails. Lynx Edicions.
- Deviche, P., McGraw, K. y Greiner, E. 2005.** Interspecific differences in hematozoan infection in Sonoran Desert *Aimophila* sparrows. *Journal of Wildlife Disease* 41:532.
- Dixon, A., Ross, D., O'Malley, S.L.C. y Burke, T. 1994.** Paternal investment inversely related to degree of extra-pair paternity in the reed bunting. *Nature* 371: 698–700.

- Dobson A, Hudson P 1995.** Microparasites: observed patterns in wild animal populations. Páginas 52-89 *en* Grenfell, B.T. y Dobson, A.P. (eds) *Ecology of Infectious Diseases in Natural Populations*. Cambridge University Press.
- Donald, P.F., Green, R.E. y Heath, M.F. 2001.** Agricultural intensification and the collapse of Europe's farmland bird populations. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 268:25-29.
- Dunn, P. 2004.** Breeding dates and reproductive performance. *Advances in Ecological Research* 35: 69-87.
- Eadie, J.McA. y Lumsden, H.G. 1985.** Is nest parasitism always deleterious to goldeneyes? *American Naturalist* 126:859-866.
- Evans, D.M., Redpath, S.M. y Evans, S.A. 2005.** Seasonal patterns in the productivity of Meadow Pipits in the uplands of Scotland. *Journal of Field Ornithology* 76:245-251.
- Fargallo, J.A., Martínez-Padilla, J., Toledano-Díaz, A., Santiago-Moreno, J. y Davila, J.A. 2007.** Sex and testosterone effects on growth, immunity and melanin coloration of nestling Eurasian kestrels. *Journal of Animal Ecology* 76:201-209.
- Fitze, P.S., Clobert, J. y Richner, H. 2004.** Long-term life-history consequences of ectoparasite-modulated growth and development. *Ecology* 85:2018-2026.
- Folstad, I. y Karter, A. 1992.** Parasites, bright males, and the immunocompetence handicap. *American Naturalist* 139:603-622.
- Fonderflick, J., Caplat, P., Lovaty, F., Thévenot, M. y Prodon, R. 2010.** Avifauna trends following changes in a Mediterranean upland pastoral system. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 137: 337-347.
- Fretwell, S.D. 1972.** *Populations in a Seasonal Environment*. Princeton University Press, Princeton.
- Futuyma, D.J. 1998.** *Evolutionary Biology*. Third Edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Gebhardt-Henrich, S. y Richner, H. 1998.** Causes of growth variation and its consequences for fitness. *Oxford Ornithology Series* 8:324-339.
- Gissing, G.J., Crease, T.J. y Middleton, A.L.A. 1998.** Extrapair paternity associated with renesting in the American Goldfinch. *Auk* 115, 230-234.
- Godet, L., Devictor, V. y Jiguet, F. 2007.** Estimating relative population size included within protected areas. *Biodiversity and Conservation* 16: 2587-2598.
- Gordo, O. y Sanz, J.J. 2005.** Phenology and climate change: a long-term study in a Mediterranean locality. *Oecologia* 146: 484-495.
- Götmark, F. 1992.** The effects of investigator disturbance on nesting birds. *Current Ornithology* 9:63-104.
- Gowaty, P.A. 2013.** Adaptively flexible polyandry. *Animal Behaviour* 86:877-884.

- Grant, T.A., Shaffer, T.L., Madden, E.M., Pietz, P.J. y Johnson, D. 2005.** Time-specific variation in passerine nest survival: new insights into old questions. *Auk* 122:661–672.
- Griffith SC, Owens IPF, Thuman KA, 2002.** Extra pair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptive function. *Mol Ecol* 11:2195–2212.
- Griffin, A.S., Alonzo, S.H. y Cornwallis, C.K. 2013.** Why do cuckolded males provide paternal care? *PLoS Biol* 11: e1001520.
- Grzybek, J., Michalak, I., Osiejuk, T.S. y Tryjanowski, P. 2008.** Densities and habitats of the Tawny Pipit *Anthus campestris* in the Wielkopolska region (W Poland). *Acta Ornithologica* 43: 221-225.
- Hagemeijer, W.J.M. y Blair, M.J. 1997.** The EBCC atlas of European breeding birds: their distribution and abundance. T. & AD Poyser.
- Hall, T.A. 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Volume 41:95–98.
- Hamilton, M.B., Pincus, E.L., Di Fiore, A. y Fleischer, R.C. 1999.** Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *Biotechniques* 27:500–507.
- Hamilton, W.J. y Orians, G.H. 1965.** Evolution of brood parasitism in altricial birds. *Condor* 67:361–382.
- Hasselquist, D.S. y Sherman, P.W. 2001.** Social mating systems and extrapair fertilizations in passerine birds. *Behavioral Ecology*, 12: 457-66.
- Hellgren, O., Waldenström, J., Pérez-Tris, J., Szöll, E., Si, Ö., Hasselquist, D., Krizanauskiene, A., Ottosson, U. y Bensch, S. 2007.** Detecting shifts of transmission areas in avian blood parasites—a phylogenetic approach. *Molecular Ecology* 16:1281–1290.
- Hillgarth, N. y Wingfield. J.C. 1997.** Testosterone and immunosuppression in vertebrates: implications for parasite-mediated sexual selection Páginas 143-155 *en* Beckage, N.E.(ed). *Parasites and pathogens*. Springer.
- Holm, S. 1979.** A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics* 6:65–70.
- Högestedt, G. 1978.** Orientation of the entrance in Tawny Pipit *Anthus campestris* nests. *Ornis Scandinavia* 9:193–196.
- Hudson, P. y Dobson, A. 1997.** Host-parasite Processes and Demographic Consequences. Páginas 128-154 *en* Clayton, D.L. y Moore J. (eds.) *Host Parasite Evolution: general principles and avian models*. Oxford University Press.
- Hudson, P.J., Dobson, A.P. y Newborn, D. 1998.** Prevention of population cycles by parasite removal. *Science* 282: 256–2258.

- Huck, M., Fernández-Duque, E., Babb, P. y Schurr, T. 2014.** Correlates of genetic monogamy in socially monogamous mammals: insights from Azara's owl monkeys. *Proceedings of The Royal Society of London B* 281:20140195.
- Huntley, B., Green, R.E., Collingham, Y.C. y Willis, S.G. 2007.** A climatic atlas of European breeding birds. Lynx Edition.
- Hutchinson, J.M.C. y Griffith, S.C. 2008.** Extra-pair paternity in the skylark *Alauda arvensis*. *Ibis* 150: 90–97.
- Illera, J.C., Emerson, B.C. y Richardson, D.S. 2007.** Population history of Berthelot's pipit: colonization, gene flow and morphological divergence in Macaronesia. *Molecular Ecology* 16:4599–4612.
- Isvaran, K. y Clutton-Brock, T. 2007.** Ecological correlates of extragroup paternity in mammals. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 274: 219–224.
- Jacobson, M.D., Tsakiris, E.T., Long, A.M. y Jensen, W.E. 2011.** No evidence for observer effects on Lark Sparrow nest survival. *Journal of Field Ornithology* 82:184–192.
- Jamieson, I.G., Quinn, J.S., Rose, P.A. y White, B.N. 1994.** Shared paternity among non-relatives is a result of an egalitarian mating system in a communally breeding bird, the pukeko. *Proceedings of the Royal Society of London B* 257: 271–277.
- Jarvi, S.I., Schultz, J.J. y Atkinson, C.T. 2002.** PCR diagnostics underestimate the prevalence of avian malaria (*Plasmodium relictum*) in experimentally-infected passerines. *Journal of Parasitology* 88:153–158.
- Jarvi, S., Farias, M., Baker, H., Freifeld, H., Baker, P., Van Gelder, E., Massey, J. y Atkinson, C. 2003.** Detection of avian malaria (*Plasmodium* spp.) in native land birds of American Samoa. *Conservation Genetics* 4:629–637.
- Jennions, M.D. y Petrie, M. 2000.** Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. *Biological Review* 75: 21–64.
- Johnson, D. 1979.** Estimating nest success: the Mayfield method and an alternative. *Auk* 96:651–661.
- Johnson, P.T.J., Rohr, J.R., Hoverman, J.T., Kellermanns, E., Bowerman, J. y Lunde, K.B. 2012.** Living fast and dying of infection: host life history drives interspecific variation in infection and disease risk. *Ecology Letters* 15, 235–242.
- Jones, O.R. y Wang, J. 2010.** COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources*, 10, 551–555.
- Ketterson, E.D. y Nolan, V. 1994.** Male parental behavior in birds. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 25: 601–628.

- Kirkpatrick, M. 1985.** Evolution of female choice and male parental investment in polygynous species: the demise of the “sexy son” *American Naturalist* 125:788–810.
- Korpimäki, E., Hakkarainen, H. y Bennett, G. 1993.** Blood parasites and reproductive success of Tengmalm’s owls: detrimental effects on females but not on males? *Functional Ecology* 7:420–426.
- Krüger, S. 1989.** *Der Brachierper Anthus campestris.*, vol 598. Ziemsen, Wittenberg Lutherstadt.
- Lack, D. 1947.** The significance of clutch-size. *Ibis* 89:302–352.
- Lack, D. 1950.** The breeding seasons of European birds. *Ibis* 92:288–316.
- Lack, D. 1954.** The natural regulation of animal numbers. Oxford University Press.
- Lack, D. 1966.** Population studies of birds. Clarendon Press, London
- Lack, D. 1968.** Ecological adaptations for breeding in birds. Methuen, London.
- Li, M., Välimäki, K., Piha, M., Pakkala, T. y Merilä, J. 2009.** Extrapair Paternity and Maternity in the Three-Toed Woodpecker, *Picoides tridactylus*: Insights from Microsatellite-Based Parentage Analysis. *PLoS ONE*, 4: e7895.
- Ligon, J.D. 1999.** The evolution of avian breeding systems. Oxford University Press Oxford, UK:Oxford University Press.
- Lloyd, P., Little, R.M. y Crowe, T.M. 2000.** Investigator effects on the nesting success of arid-zone birds. *Journal of Field Ornithology* 71:227–235.
- López-López, P., Falcucci, L., Barba, A., Maiorano, E. y Boitani, L. 2011.** Hotspots of species richness, threat and endemism for terrestrial vertebrates in SW Europe. *Acta Oecologica* 37:399–412.
- Lyon, B.E. y Eadie, J.M. 2008.** Conspecific brood parasitism in birds: a life-history perspective. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 39, 343–363.
- Magnhagen, C. 1991.** Predation risk as a cost of reproduction. *Trends in Ecology & Evolution* 6:183–186.
- Major, R.E. 1990.** The effect of human observers on the intensity of nest predation. *Ibis* 132:608–612.
- Mallord, J., Dolman, P., Brown, A. y Sutherland, W. 2008.** Early nesting does not result in greater productivity in the multi-brooded Woodlark *Lullula arborea*. *Bird Study* 55:145–151.
- Martin, T. 1987.** Food as a limit on breeding birds: a life-history perspective. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:453–487.
- Martin, T.E. 1991.** Food limitation in terrestrial breeding birds: is that all there is? *Acta Congr Int Orn* 20:1595–1602.
- Martin, T.E. 1993.** Nest predation among vegetation layers and habitat types: revising the dogmas. *American Naturalist* 141:897–913.

- Martin, T.E., Scott, J. y Menge, C. 2000.** Nest predation increases with parental activity: separating nest site and parental activity effects. *Proceedings of the Royal Society B* 267:2287–2293.
- Martin, T.E., Lloyd, P., Bosque, C., Barton, D.C., Biancucci, A.L., Cheng, Y.R. y Ton, R. 2011.** Growth rate variation among passerine species in tropical and temperate sites: an antagonistic interaction between parental food provisioning and nest predation risk. *Evolution* 65:1607–1622.
- Mata Olmo, R. y Sanz, C. 2013.** Geografía de España y sus Paisajes. Servicio de Publicaciones de la UNED. Madrid.
- Mauck, R.A., Marschall, E.A. y Parker, P.G. 1999.** Adult survival and imperfect assessment of parentage: effects on male parenting decisions. *American Naturalist* 154: 99-109.
- Mayer, C. y Pasinelli, G. 2013.** New support for an old hypothesis: density affects extra-pair paternity. *Ecology and Evolution*, 3, 694–705.
- Mayfield, H. 1975.** Suggestions for calculating nest success. *The Wilson Bulletin* 87:456–466.
- McCurdy, D.G., Shutler, D., Mullie, A. y Forbes, M.R. 1998.** Sex-biased parasitism of avian hosts: relations to blood parasite taxon and mating system. *Oikos* 82:303-312.
- McRae, S.B. 1997.** A rise in nest parasitism enhances the frequency of intraspecific brood parasitism in a moorhen population. *Journal of Animal Ecology* 66:143–153.
- Méndez, M., Prats, L., Tella, J.L. y Godoy, J.A. 2010.** Isolation and characterization of twenty polymorphic microsatellite markers for the endangered Dupont's lark (*Chersophilus duponti*) and cross-amplification in crested lark (*Galerida cristata*) and Thekla lark (*Galerida theklae*). *Conservation Genetics Resources* 3:1–5.
- Møller, A.P., Allander, K. y Dufva, R. 1990.** Fitness effects of parasites on passerine birds: a review. Páginas 269-280 *en* Blondel, J. y Gosler, A., Lebreton, J.D y McCleery, R.H., eds. *Population biology of passerine birds: an integrated approach*. Berlin: Springer.
- Møller, A.P. 2000.** Male parental care, female reproductive success, and extrapair paternity. *Behavioural Ecology* 11:161-68.
- Møller, A.P. y Cuervo, J.J. 2000.** The evolution of paternity and paternal care in birds. *Behavioural Ecology* 11: 472 –485.
- Møller, A.P. y Saino, N. 2004.** Immune response and survival. *Oikos* 104(2): 299-304.
- Møller, A.P., Arriero, E., Lobato, E. y Merino, S. 2009.** A meta-analysis of parasite virulence in nestling birds. *Biological Reviews* 84: 567-588.

- Møller, A.P. y 36 autores. 2013.** Assessing the Effects of Climate on Host-Parasite Interactions: A Comparative Study of European Birds and Their Parasites. *PLoS One* 8(12): e82886.
- Moreno, J. 2002.** La evolución de estrategias vitales. Páginas 159-176 en Soler, M. (ed.). *Evolución. La base de la biología*. Manuel Soler Editor. Granada.
- Moreno, J. 2004.** Avian reproduction in a Mediterranean context: contributions of ornithological research in Spain. *Ardeola* 51:51-70.
- Mougeot, F., Redpath, S.M. y Piertney, S.B. 2006.** Elevated spring testosterone increases parasite intensity in male red grouse. *Behavioral Ecology* 17:117-125.
- Nagy, L.R. y Holmes, R.T. 2004.** Factors influencing fecundity in migratory songbirds: is nest predation the most important? *Journal of Avian Biology* 6:487-491.
- Newton, I. 1989.** *Lifetime Reproduction in Birds*. Academic Press, London, UK.
- Nunn, C.L. y Altizer, S. 2006.** *Infectious Diseases in Primates: Behavior, Ecology and Evolution*. Oxford University Press.
- Oddie, K.R. 2000.** Size matters: competition between male and female great tit offspring. *Journal of Animal Ecology* 69:903-912.
- Olson, V.A., Webb, T.J., Freckleton, R.P. y Székely, T. 2009.** Are parental care trade-offs in shorebirds driven by parental investment or sexual selection. *Journal of Evolutionary Biology* 22:672-682.
- Oosterhout, C.V., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M. y Shipley, P. 2004.** Microchecker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:535-538.
- Osiejuk, T.S., Grzybek, J. y Tryjanowski, P. 2007.** Song structure and repertoire sharing in the Tawny Pipit *Anthus campestris* in Poland. *Acta Ornithologica* 42: 157-165.
- Owen-Ashley, N.T., Hasselquist, D. y Wingfield, J.C. 2004.** Androgens and the immunocompetence handicap hypothesis: unraveling direct and indirect pathways of immunosuppression in song sparrows. *American Naturalist* 164:490-505.
- Payne, R.B. 1977.** Ecology of brood parasitism in birds. *Annual Review of Ecology and Systematics* 8:1-28.
- Pease, C.M., y Grzybowski, J.A. 1995.** Assessing the consequences of brood parasitism and nest predation on seasonal fecundity in passerine birds. *Auk* 112:343-363.
- Peinado, M. y Rivas-Martínez, S. 1987.** *La vegetación de España*, vol. 3. Colección Aula Abierta. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares.

- Pérez-Tris, J. y Bensch, S. 2005.** Dispersal increases local transmission of avian malarial parasites. *Ecology Letters* 8:838–845.
- Perrins, C. 1970.** The timing of birds' breeding seasons. *Ibis* 112:242–255.
- Petrie, M. y Kempenaers, B. 1998.** Extra-pair paternity in birds: explaining variation between species and populations. *Trends in Ecology and Evolution* 13:52–58.
- Posada, D. 2008.** jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25:1253–1256.
- Poulin, R. 1996.** Sexual inequalities in helminth infections: a cost of being a male? *American Naturalist* 147:287–295.
- Poulin, R. 2007.** *Evolutionary Ecology of Parasites*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Purroy, F. 1997.** *Atlas de las Aves de España (1975-1995)*. Lynx Editions. Barcelona.
- R Core Team. 2013.** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at: <http://www.R-project.org/>.
- Rambaut, A. 2007.** FigTree, a graphical viewer of phylogenetic trees. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Raymond, M. y Rousset, F. 1995.** Genepop Version.4.0: Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86:248–249.
- Remeš, V. y Martin, T.E. 2002.** Environmental influences on the evolution of growth and developmental rates in passerines. *Evolution* 56:2505–2518.
- Reyer, H-U., Bollmann, K., Schläpfer, A.R., Schymainda, A. y Klecack, G., 1997.** Ecological determinants of extrapair fertilizations and egg dumping in Alpine water pipits (*Anthus spinoletta*). *Behaviour Ecology* 8: 534-543.
- Ricklefs, R.E. 1969.** An analysis of nesting mortality in birds, vol 9. Smithsonian contributions to zoology. Smithsonian Institution Press, Washington.
- Roche, J.C. 2002.** *Guía sonora de las aves de Europa*. Editorial Lynx Edicions.
- Roff, D.A. 1992.** *The evolution of life histories: Theory and analysis*. New York: Chapman & Hall.
- Ronquist, F. y Huelsenbeck, J. 2003.** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572.
- Round, P.D., Hansson, B., Pearson, D.J., Kennerley, P.R. y Bensch, S. 2007.** Lost and found: the enigmatic large-billed reed warbler *Acrocephalus orinus* rediscovered after 139 years. *Journal of Avian Biology* 38:2 133.

- Rozen, S. y Skaletsky, H. 2000.** Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Páginas 365-386 *en* Krawetz, S. y Misener, S. (eds) Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology. Humana Press, Totowa.
- Santos, E.S.A. y Nakagawa, S. 2013.** Breeding Biology and Variable Mating System of a Population of Introduced Dunnocks (*Prunella modularis*) in New Zealand. PLoS One 8(7): e69329.
- Sanz, J.J. 1997.** Geographic variation in breeding parameters of the Pied Flycatcher *Ficedula hypoleuca*. Ibis 139:107-114.
- Sanz, J.J. 2002.** La evolución de los sistemas de apareamiento. Páginas 271-282 *en* Soler, M. (ed). Evolución: la base de la biología. Proyecto Sur de Ediciones, S.L.
- Schalk, G. y Forbes, M.R. 1997.** Male biases in parasitism of mammals: effects of study type, host age, and parasite taxon. Oikos 78:67-74.
- Schielzeth, H. 2010.** Simple means to improve the interpretability of regression coefficients. Methods in Ecology and Evolution 1:103-113.
- Schmidt, K.A. y Whelan, C.J. 1999.** The relative impacts of nest predation and brood parasitism on seasonal fecundity in songbirds. Conservation Biology 13:46-57.
- Shaffer, T. 2004.** A unified approach to analyzing nest success. Auk 121:526-540
- Sheldon, B.C. y Verhulst, S. 1996.** Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. Trends in Ecology & Evolution 11: 317-321.
- Skorping, A. y Jensen, K.H. 2004.** Disease dynamics: all caused by males? Trends in Ecology & Evolution 19:219-220.
- Skutch, A.F. 1949.** Do tropical birds rear as many young as they can nourish. Ibis 91:430.
- Slagsvold, T. 1982.** Clutch size variation in passerine birds: the nest predation hypothesis. Oecologia 54:159-169.
- Slatyer, R.A., Mautz, B.S., Backwell, P.R.Y. y Jennions, M.D. 2012.** Estimating genetic benefits of polyandry from experimental studies: a meta-analysis. Biological Review 87:1-33.
- Sol, D., Jovani, R. y Torres, J. 2003.** Parasite mediated mortality and host immune response explain age-related differences in blood parasitism in birds. Oecologia 135:542-547.
- Solomon, M.E. 1949.** The Natural Control of Animal Populations. Journal of Animal Ecology 18: 1-35.
- Stearns, S.C. 1976.** Life history tactics: a review of the ideas. Quarterly Review of Biology 51:3-47.

- Stearns, S.C. 1992.** The evolution of life histories. New York: Oxford Univ. Press.
- Stutchbury, B.J.M. 1998.** Breeding synchrony best explains variation in extra-pair mating system among avian species. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 43:221–222.
- Suárez, F. y Manrique, J. 1992.** Low breeding success in Mediterranean shrubsteppe passerines: thekla lark *Galerida theklae*, lesser short-toed lark *Calandrella rufescens*, and black-eared wheatear *Oenanthe hispanica*. *Ornis Scandinavica* 23:24–28
- Suárez, F., Yanes, M., Herranz, J. y Manrique, J. 1993.** Nature reserves and the conservation of berian shrubsteppe passerines: the paradox of nest predation. *Biological Conservation* 64(1): 77–81.
- Suárez, F., Morales, M.B., Minguez, I. y Herranz, J. 2005a.** Seasonal variation in nest mass and dimensions in an open-cup groundnesting shrub-steppe passerine: the Tawny Pipit *Anthus campestris*. *Ardeola* 52:43–51.
- Suárez, F., Traba, J. y Herranz, J. 2005b.** Body mass changes in female Tawny Pিপits *Anthus campestris* during the nesting stage. *Journal of Ornithology* 146:372–376.
- Suárez, F., Herranz, J., Yanes, M., Sánchez, A.M., García, J.T. y Manrique, J. 2005c.** Variación estacional e interanual en la reproducción de cuatro alondras en España mediterránea: fecha y tamaño de puesta, tamaño de los huevos y asincronía de puesta. *Ardeola* 52:103–117.
- Svensson, E. 1995.** Avian reproductive timing: when should parents be prudent? *Animal Behaviour* 49:1569–1575.
- Szép, T. y Møller, A. 1999.** Cost of parasitism and host immune defence in the sand martin *Riparia riparia*: a role for parent-offspring conflict? *Oecologia* 119:9–15.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. y Kumar, S. 2007.** MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596.
- Tompkins, D.M., Dobson, A.P., Arneberg, P., Begon, M.E., Cattadori, I.M., Greenman, J.V., Heesterbeek, J.A.P., Hudson, P.J., Newborn, D., Pugliese, A., Rizzoli, A.P., Rosá, P., Rossa, F. y Wilson, K. 2002.** Parasites and host population dynamics. Páginas 45–62 en Hudson, P.J., Rizzoli, A., Grenfell, B.T., Heesterbeek, H. y Dobson, P.J., eds. *The Ecology of Wildlife Diseases* pp. 45–62. Oxford University Press, Oxford.
- Trivers, R.L. 1972.** Parental investment and sexual selection. Páginas 136–179 en Campbell, B. (ed) *Sexual selection and the descent of man, 1871–1971*. Aldine-Atherton, Chicago.

- Tryjanowski, P. y Kuzniak, S. 1999.** Effect of research activity on the success of Red-backed Shrike *Lanius collurio* nests. *Ornis Fennica* 76:41–43.
- Tyler, S.J. 2004.** Family Motacillidae (pipits and wagtails). Páginas 119-139 *en* Del Hoyo, J., Elliott, A., y Christie, D., eds. Handbook of the birds of the world (volume 9): Cotingas to Pipits and Wagtails. Lynx, Barcelona.
- Valkiunas, G. 2005.** Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia. CRC press.
- Van der Most, P.J., de Jong, B., Parmentier, H.K. y Verhulst, S. 2011.** Trade-off between growth and immune function: a meta-analysis of selection experiments. *Functional Ecology* 25:74–80.
- Van Oers, K., Richardson, D., Sæther, S. y Komdeur, J. 2010.** Reduced blood parasite prevalence with age in the Seychelles Warbler: selective mortality or suppression of infection? *Journal of Ornithology* 151:69–77.
- Verhulst, S. y Nilsson, J.A. 2008.** The timing of birds' breeding seasons; a review of experiments that manipulated timing of breeding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 363, 399–410.
- Waldenström, J., Bensch, S., Hasselquist, D. y Östman, Ö. 2004.** A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting Plasmodium and Haemoproteus infections from avian blood. *Journal of Parasitology* 90:191–194.
- Wang, J. 2004.** Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. *Genetics* 166: 1963-1979.
- Wang, J. y Santure, A.W. 2009.** Parentage and sibship inference from multilocus genotype data under polygamy. *Genetics* 181: 1579–1594.
- Weatherhead, P.J., Blouin-Demers, G. y Cavey, K.M. 2003.** Seasonal and prey-size dietary patterns of black ratsnakes (*Elaphe obsoleta obsoleta*). *The American Midland Naturalist* 150:275–281.
- Weidinger, K. 2008.** Nest monitoring does not increase nest predation in open-nesting songbirds: inference from continuous nest survival data. *Auk* 125:859–868.
- Westneat, D.F., Sherman, P.W. y Morton, M.L. 1990.** The ecology and evolution of extrapair copulations in birds. *Current Ornithology* 7:331–369.
- Westneat, D.F. y Webster, M.S. 1994.** Molecular analysis of kinship in birds: interesting questions and useful techniques. Páginas 91-126 *en* Schierwater, B., Streit, B., Wagner, G.P. y DeSalle, R. (eds) Molecular ecology and evolution: approaches and applications. Basel: Birhauser Verlag.
- Westneat, D.F. y Sargent, R.C. 1996.** Sex and parenting—the effects of sexual conflict and parentage on parental strategies. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 87 -91.
- Westneat, D.F. y Sherman, P.W. 1997.** Density and extra-pair fertilizations in birds: A comparative analysis. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 41:205–215.

- Westneat, D.F. y Stewart, I.R.K. 2003.** Extra-pair paternity in birds: causes, correlates, and conflict. *Annual Review in Ecology and Systematics* 34:365–396.
- Wink, M. y Dyrce, A. 1999.** Mating systems in birds: A review of molecular studies. *Acta Ornithologica* 34:91-109.
- Wood, M.J., Cosgrove, C.L., Wilkin, T.A., Knowles, S.C.L., Day, K.P. y Sheldon, B.C. 2007.** Within-population variation in prevalence and lineage distribution of avian malaria in blue tits, *Cyanistes caeruleus*. *Molecular Ecology* 16:3263–3273.
- Wood, E., Matthews, J., Stephenson, S., Slote, M. y Nussey, D. 2013.** Variation in fecal egg counts in horses managed for conservation purposes: individual egg shedding consistency, age effects and seasonal variation. *Parasitology* 140:115–128.
- Wright, L., Hoblyn, R., Green, R., Bowden, C., Mallord, J., Sutherland, W. y Dolman, P. 2009.** Importance of climatic and environmental change in the demography of a multi-brooded passerine, the woodlark *Lullula arborea*. *Journal of Animal Ecology* 78:1191–1202.
- Yanes, M. y Suárez, F. 1995.** Nest predation patterns in ground-nesting passerines on the Iberian Peninsula. *Ecography* 18:423–428.
- Yanes, M. y Suárez, F. 1996.** Incidental nest predation and lark conservation in an Iberian semiarid shrubsteppe. *Conservation Biology* 10:881–887.
- Yanes, M. y Suárez, F. 1997.** Nest predation and reproductive traits in small passerines: a comparative approach. *Acta Oecologica* 18: 413-426.
- Yom-Tov, Y. 2001.** An updated list and some comments on the occurrence of intraspecific nest parasitism in birds. *Ibis* 143:133–143.
- Zehtindjiev, P., Križanauskienė, A., Scebba, S., Dimitrov, D., Valkiūnas, G., Hegemann, A., Tieleman, B.I. y Bensch, S. 2012.** Haemosporidian infections in skylarks (*Alauda arvensis*): a comparative PCR-based and microscopy study on the parasite diversity and prevalence in southern Italy and the Netherlands. *European Journal of Wildlife Research* 58:335–344.
- Zuk, M. 1990.** Reproductive strategies and disease susceptibility: an evolutionary viewpoint. *Parasitology Today* 6:231–233.
- Zuk, M. y Stoehr, A.M. 2010.** Sex differences in susceptibility to infection: an evolutionary perspective. Páginas 1-17 *en* Klein, S.L. y Roberts, C. (eds) Sex hormones and immunity to infection. Springer.

Agradecimientos

Una tesis no puede hacerse si no se han tenido buenos maestros, y por eso yo se la quiero dedicar a dos de los míos: el primero fue mi abuelo Antonio, que desde niña se empeño en satisfacer y fomentar todas mis curiosidades bajo el prisma de la ciencia. Y a Quico, por supuesto, por contagiarme el entusiasmo que hace que plantear y resolver preguntas sea algo apasionante (y por ayudarnos a conseguir el *tractor amarillo*, que ha sido el mejor coche de campo que se puede tener para hacer esta tesis, oseaase bruuutal).

Más maestros. Papá. De ti he aprendido a ver el vaso medio lleno y a valorar cada cosa que nos ofrece la vida. De ti, mamá, a luchar contra la corriente con la fuerza necesaria para poder llegar a la meta. También os tengo que agradecer a ambos vuestra ayuda con la intendencia, como ayudar a limpiar la casa de campo (con alcaravanes descongelados putrefactos incluidos), hacer bolsitas colectoras para los bisbitas o surtir de material cuando se acababan a última hora. Aprovecho para pedir os disculpas por las preocupaciones que se que os han causado el hecho de realizar algunos de los muestreos y temporadas de campo sola en los páramos.

Ya que estoy con la familia, gracias hermana por ser como eres, por dibujar bisbitas, gangas, portadas o lo que tocara, por acogerme cuando el coche de campo se estropeaba o por llevarme a recorrer el páramo con tu coche poniendo en riesgo sus ruedas (que obviamente no salieron indemnes).

Lo siguiente que me gustaría agradecer es la oportunidad de haber podido hacer una tesis con beca oficial, cosa que hoy no sería posible. Así que gracias al CSIC por el programa I3P de becas predoctorales que espero que recupere pronto... Lo mismo digo de los proyectos de investigación (PAC06-0137 y PII1C09-0128-4724 y por el proyecto CSIC-MICINN PIE 201030I019) que han permitido que se estudie un

pajarito que poca gente conoce, que poco llama la atención, y que no sirve para gran cosa; me siento muy afortunada por ello y espero que se puedan seguir haciendo este tipo de estudios en un futuro.

Nada hubiera sido igual si no hubiera empezado este viaje con la alondra ricotí. Empezar cuando no sabes nada con un ave tan difícil de ver, de censar, de capturar, fue un gran reto y además de enseñarme mucho, me permitió compartir muchas experiencias inolvidables, divertidas, heladoras e instructivas, con cada uno de los miembros del equipo de la UAM, cada día de capturas, cada censo y en especial cada expedición a Marruecos. Gracias Quico, Vicente, Jorge, Isra y Raquel por compartir vuestra experiencia y aceptarme en vuestro equipo en aquellos inicios. Gracias Jorge también por enseñarme a anillar, sin tus sesiones de anillamiento de gorriones chillones no hubiera podido hacer esta tesis. También gracias a los sisoneros, Eladio, que fuiste el primero en sacarme al campo a pitar sisonos. Y Manolo, porque como buen tutor me has tenido siempre muy bien informada de los cambios en las normativas y papeleos. Jesus, gracias por tus ánimos, por compartir tu experiencia bisbitera en Layna y tu experiencia con todo tipo de aparatejos, estaciones meteorológicas, videocámaras o trampas, que tanto nos han ayudado en el campo. Al resto gracias por vuestro cariño.

Luego llegaron los IREQUIS. Javi Viñuela, Dávila, Carlos, Martín, Bea y François, porque nunca imaginé que tomar cervezas, cenar, o jugar al billar contaran como clases de ciencia y vida, gracias. Gracias Loren y Jesús por vuestros consejos y discusiones. En general gracias a toda la gente del IREC que ha hecho que el día a día sea más amable. De los viajes me llevo principalmente grandes amigos. En Escocia a Cat, Fabian y Pedro, porque en ocasiones hay que irse lejos para darte cuenta de la gente genial que tienes cerca. En especial gracias a ti, Cat, porque estés donde estés siempre estás cerca, y si es necesario te apuntas a capturar bisbitas (con lo que te gustan a ti los bichos con plumas). En la República Checa thank you Vasek and family for making me feel at home and share with me your enthusiasm in the study of

tawny pipits. Czech tawny pipits gave me a lot of energy to finish this PhD. Tawny pipits there are lucky to have people like you taking care of them.

De los tres lugares donde se ha realizado esta tesis:

a) En el campo. Gracias a Ana, Nuria y María por aguantarme a mi y a las largas jornadas de campo. Ana, sin tus ánimos y alegría mi primer año de campo hubiera sido mucho más duro y no lo hubiera disfrutado tanto. A los visitantes que tanto se valoran cuando aparecen por el páramo (Quico, Carlos Martín, Jorge, Viñu y Julien) y más aún cuando no son pajareros (Fer, Patri y Raquel). Gracias a los vecinos de Las Salinas y de Olmeda del Rey y en especial a Teo y a Amós. Y aunque no son parte de esta tesis, gracias por la ayuda con las poblaciones de bisbitas de Murcia a Cristian y de León a Javier.

b) En el laboratorio. Gracias a Dolo y a María por aguantarme también, a Inés, a Pedro y a Fer por aconsejarme, y a Conchi y Victor por alegrar el ambiente.

c) En el despacho (P2). Gracia a mis amigos Fer y Ana. Ha sido genial teneros de compis estos años ¡viva San Fermin!. No saben los yanquis y holandeses la suerte que tienen de teneros por allí, ojala podáis volver pronto (como todos los investigadores exiliados), os deseo lo mejor. Lady ganga, no te perdonaré que no vinieras ni un solo día de bisbitas, pero gracias por tu alegría y tus ánimos. Fer, gracias porque he aprendido mucho de ti y por estar siempre disponible para lo que sea. Tu sí que viniste a buscar nidos bajo la lluvia, y no como la petarda de Ana. Ya que me has pedido que no de *gracias* a mis perros voy a aprovechar para hacerlo en tu sección, para que te horrorices: gracias a los más camperos y canallas: Tris, Yebel, Jara, Golfa, Rai y Ness. Tras los perros va Xurxo, gracias por compartir citas y libros siempre a favor de los bisbitas.

Gracias también a mi pequeño y privado panel de revisores angloparlantes: Patri, Cat, Bea, Fer y Ana.

A los biólogos, a unos (Pablo) por empujarme a subir al departamento a hablar con Quico para que me dirigiera un proyecto de fin de carrera sobre las cabras montesas en la Pedriza...(allí empezó todo), a otros por lo que me han enseñado de pájaros (Jose y Eduardo), por ayudarme pacientemente a maquetar esta tesis (Beti), y a otros por estar ahí durante estos años (Javi y Mentxu). Patri, te incluiré también aquí por eso de que eres bióloga, aunque también maestra, revisora, animadora, vales para todo amiga, gracias.

A mi director, por confiar en mi y permitirme que me descentrara con otros temas, por no presionarme, y por compartir tantas discusiones y horas de campo.

Y finalmente, y en orden de aparición en la vida, gracias a ti Marina, por ayudarme con la finalización de la tesis al mostrarme la cruda realidad y hacer que entendiera realmente lo que es la importancia del cuidado parental, los altos costes que impone la reproducción, y la importancia de una buena elección de pareja. Menos mal que tu padre si que realiza un buen cuidado parental no como los machos de bisbita.